

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000016

International filing date: 05 January 2005 (05.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0000440
Filing date: 05 January 2004 (05.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 March 2005 (30.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/KR 2005 / 000016

RO/KR 05.03.2005



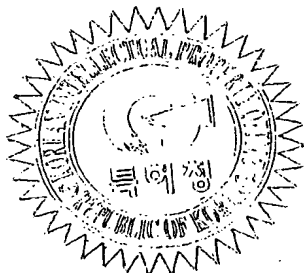
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0000440
Application Number

출원 년 월 일 : 2004년 01월 05일
Date of Application JAN 05, 2004

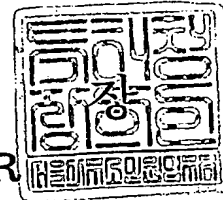
출원인 : 바이오메드포토닉스 주식회사 외 1명
Applicant(s) Bio-MED Photonics Co.,Ltd., et al.



2005 년 01 월 06 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.01.05
【발명의 명칭】	측방 유동 정량 검정 방법 및 이를 위한 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치 및 소형 스캐너
【발명의 영문명칭】	A method for the detection of lateral flow assay and strip and Laser-induced Epifluorescence and compact scanner therefor
【출원인】	
【명칭】	바이오메드포토닉스 주식회사
【출원인코드】	1-2002-013118-7
【출원인】	
【명칭】	바디텍메드 주식회사
【출원인코드】	1-1999-028691-4
【대리인】	
【성명】	손민
【대리인코드】	9-1999-000420-6
【포괄위임등록번호】	2002-027301-7
【포괄위임등록번호】	2002-007356-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	남기봉
【성명의 영문표기】	NAHM, Kie Bong
【주민등록번호】	610325-1095024
【우편번호】	135-280
【주소】	서울특별시 강남구 대치동 612 국제아파트 2-409
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최의열
【성명의 영문표기】	CHOI, Eui Yeol
【주민등록번호】	680414-1702719

【우편번호】 200-150
【주소】 강원도 춘천시 우두동 1068 삼성아파트 102-1205
【국적】 KR
【발명자】
【성명】 김재훈
【출원인코드】 4-2001-039540-7
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의
한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
손민 (인)
【수수료】
【기본출원료】 97 면 38,000 원
【가산출원료】 0 면 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 15 항 589,000 원
【합계】 627,000 원
【감면사유】 소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】 188,100 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 레이저 유발 형광 검출법의 원리를 응용하여 질병의 표지가 되는 물질을 함유한 측방유동 검정용 칩에서 표지 물질이 입사되는 레이저광에 의하여 발광되는 형광을 검출하여 분석함으로써 해당 물질의 정량적 농도 및 공간적 분포를 확인할 수 있는 측방 유동 정량 검정 방법 및 이를 위한 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치 및 소형 스캐너에 관한 것으로,

일선 병원에서 진단시점에서 바로 진단결과를 정량적으로 확인할 수 있고 특정 질환과 관련된 측방유동 검출식 바이오칩을 최적화함으로써 목표로 하는 표지인자의 검출에 특화된 성능을 발휘하며, 더욱 정확한 분석물의 정량화를 가능하게 하고, 한번의 시료 분석을 통하여 여러 암표지 인자들을 동시에 분석할 수 있도록 하며, 후크이펙트(Hook effect)를 줄이고 검출 범위를 넓히고, 분석물의 농도를 정확하게 측정할 수 있는 측방 유동 정량 검정 방법 및 이를 위한 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치 및 소형 스캐너를 제공한다.

【대표도】

도 3

【색인어】

레이저 유발 표면형광 검출 장치, 1차원 주사식, 형광분석, 휴대식 형광 스캐너

【명세서】

【발명의 명칭】

측방 유동 정량 검정 방법 및 이를 위한 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치 및 소형 스캐너{A method for the detection of lateral flow assay and strip and Laser-induced Epifluorescence and compact scanner therefor}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 종래 측방 유동 정량 검정 스트립의 일예를 도시하는 사시도이다.

도 2는 종래 측방 유동 정량 검정 스트립의 다른 예를 도시하는 사시도이다.

도 3은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 측방 유동 정량 검정 스트립을 도시하는 사시도이다.

도 4는 도 1에 도시된 종래 측방 유동 정량 검정 스트립의 평면도이다.

도 5는 도 2에 도시된 종래 측방 유동 정량 검정 스트립의 평면도이다.

도 6은 도 3에 도시된 본 발명의 측방 유동 정량 검정 스트립의 평면도이다.

도 7은 도 1에 도시된 종래 측방 유동 정량 검정 스트립의 측면도이다.

도 8은 도 2에 도시된 종래 측방 유동 정량 검정 스트립의 측면도이다.

도 9는 도 3에 도시된 본 발명의 측방 유동 정량 검정 스트립의 측면도이다.

도 10은 종래의 레이저 유발 표면 형광 검출 장치의 단면도이다.

도 11은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 소형 스캐너의 레이저 유발 표면형광 검출 장치의 단면도이다.

도 12는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 소형 스캐너의 회로적인 블록도이다.

도 13은 본 발명의 스트립과 카트리지의 하우징 벽면의 경사 상태를 도시하는 단면도이다.

도 14는 본 발명의 카트리지의 단면도이다.

도 15는 pH 페이퍼나 단백질에 부착된 지시자를 이용하여 샘플이 투입된 후 일정 시간이 지난 다음 판독하여 분석물 농도를 측정하는 상태를 도시하는 도면이다.

도 16은 스트립 위에 시간 관리선으로서 항탐지자 리간드를 분주하여 탐지자가 쌓여 형광을 발할 때 판독하여 분석물 농도를 측정하는 상태를 도시하는 도면이다.

도 17은 은 또는 탐지자가 반응할 수 있는 은선을 시험선의 후방에 분주하여 고정하고 탐지자와 혼합된 은의 양이 정상인 경우의 본 발명의 다른 실시예에 따른 스트립의 샘플 흐름을 나타내는 단면도이다.

도 18은 도 17의 신호의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 19는 은 또는 탐지자가 반응할 수 있는 은선을 시험선의 후방에 분주하여 고정하고 탐지자와 혼합된 은의 양이 과도하게 많은 경우의 본 발명의 다른 실시예에 따른 스트립의 샘플 흐름을 나타내는 단면도이다.

도 20은 도 19의 신호의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 21은 분석물인 대사물질 조절 단백질(CRP)이 없는 경우 신호의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 22는 CRP가 $1-10\mu\text{g/ml}$ 인 경우 신호의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 23은 CRP가 $10\mu\text{g/ml}$ 보다 많은 경우 신호의 변화를 나타내는 그래프이다.

도면의 주요부분에 대한 부호의 설명

- | | |
|----------------------|-------------------|
| 20 : 측방 유동 정량 검정 스트립 | 21 : 지지대 |
| 22 : 접착제 | 23 : 크로마토그래피 매질 |
| 24 : 샘플 패드 | 25 : 결합제 방출 패드 |
| 26 : 흡수 패드 | 27 : 제2 표준선 |
| 28 : 제1 표준선 | 29 : 시험선 |
| 31 : 광수신부 | 32 : 아날로그 디지털 변환기 |
| 33 : CPU | 34 : 이송장치 |
| 35 : 위치센서 | 36 : 입력부 |
| 37 : 메모리 | 38 : 전원 감시부 |
| 39 : 출력부 | 40 : 표시부 |
| 40' : 프린터 | 41 : 입사필터 |
| 42 : 광검출기 | 43 : 공간필터 |
| 44 : 집광렌즈 | 45 : 형광필터 |
| 46 : 포집렌즈 | |

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<39> 혈액 또는 뇨와 같은 생검물에 함유된 미량의 물질을 정성 또는 정량함으로써 이루어지는 새로운 진단방법과 진단기구의 개발이 지난 30 여년간 빠르게 진행되었고, 현재도 빠른 속도로 발전하고 있다. 1950년대 방사선 동위원소를 이용한 방사능면역분석법(RIA)이 처음으로

도입된 이래 효소면역분석법(ELISA)이 70년대와 80년대에 개발되고 발전되었다. 현재 ELISA 면역분석법은 가장 많이 사용되고 있는 방법 중의 하나이며 의학이나 생명과학의 연구에서 필수적인 도구가 되었다. 최근에는 변형된 ELISA 분석법이 개발되었는데, 96-웰 내부에 다수의 항체를 고정화하여 한꺼번에 많은 수의 시료를 분석하는 방법도 이들 중의 하나이다.

<40> RIA나 ELISA를 포함하는 전형적인 면역진단법에서는 대개 시료 당 한 종류의 분석물을 복잡하고, 다단계과정을 거치며, 실험실에서만 구비된 고가의 분석기기를 사용하여 정량화할 수 있다. 따라서, 이러한 시설이나 설비가 갖추어 지지 않은 소규모의 병원, 응급실, 가정, 등에서 사용하기 용이하지 않다. 이러한 약점을 보완하기 위하여 고안된 진단제품이 면역크로마토그래피 방법을 이용한 간편용 진단 키트이다.

<41> 면역크로마토그래피 방법을 진단 키트로 전혈, 혈청, 뇨 등의 생검물을 고안된 기구에 적용하여 15 분 이내에 검사결과를 확인할 수 있다. 면역크로마토그래피 분석법의 대표적인 타입으로 측방유동분석법(lateral flow assay)을 들 수 있다. 이 측방유동분석 타입의 키트 구조를 살펴보면 시료가 적용되는 샘플패드(sample pad), 탐지용 항체가 코팅되어 있는 방출패드(releasing pad), 시료가 이동하여 분리되고 항체 항원 반응이 일어나는 전개용 막(주로, 니트로셀룰로스) 또는 스트립, 그리고 시료가 계속하여 이동하기 위한 흡수패드(absorption pad)로 되어 있다. 탐지용 항체는 탐지를 표지하기 위하여 예를 들면 콜로이드성 금입자에 고정되어 있다. 금 입자 대신 라텍스 비드(latex bead) 또는 탄소입자를 사용하기도 한다. 측방유동분석용 진단 키트는 대개 샌드위치 형태로 분석물을 탐지하도록 고안되어 있다. 액체 시료 속에 들어 있는 분석물은 샘플패드에 적용되어 이동하기 시작하면서 먼저 방출패드에 비고정적으로 코팅되어 있는 탐지용 항체와 반응을 하여 항원-항체 결합체 형태로 계속하여 전개된다. 이동하면서 전개막에 고정되어 있는 포획 항체와 한번 더 반응을 하여 샌드위치

형태의 복합체를 만든다. 포획 항체는 전개막에 고정되어 있기 때문에 항원-항체 반응이 계속 하여 일어나면 복합체의 축적이 포획 항체의 고정면에서 이루어진다. 단백질은 육안으로는 투명하기 때문에 복합체의 생성 여부와 상대적인 양을 부착된 금 입자 또는 은 입자의 양으로 판단한다.

<42> 이와 같은 측방 유동 분석법은 임신진단, 암진단, 미생물탐지 등 다양한 분야에서 널리 사용되고 아주 간편하게 진단할 수 있으나 판단이 육안으로 이루어지는 까닭에 정확한 양을 확인하기 어려운 점이 따른다. 특히, 판단이 컷오프 값(cut-off value) 부근에서 이루어져야 할 경우에는 정확하게 진단하기가 용이하지 않다. 예를 들어, 전립선암의 경우 컷오프 값이 4 ng/ml인데 실제 값이 3.9 ng/ml와 같이 아주 유사한 경우 정확한 판단이 매우 어렵다.

<43> 면역진단법은 빠르게 발전하고 있어 멀지 않은 미래에는 보다 단순하고 빠르게 시료를 확인하고 분석하여 질병의 상태를 진단할 수 있을 것이다. 현재까지 정량화가 가능한 RIA 방법이나 ELISA 방법은 시료에서 분석물의 정량화를 위하여 효소를 처리하고 세척하는 등의 몇 단계를 거쳐야 한다. 마찬가지로 기존의 간편용 진단 키트는 정량화에 어려움이 따른다. 따라서, 보다 빠르고, 간편하고, 그리고 고감도로 정량화가 가능한 일반적인 분석법이 더욱 더 필요한 시점이다. 이 방법은 훈련되지 않은 일반인이 장소에 구애받지 않고 진단이나 분석이 가능해야 하는 것이다.

<44> 또한, 면역검증기법(Immunassay Technology)은 DNA 칩 또는 멤브레인을 이용한 단백질 칩을 이용하여 취득한 생체 시료에 포함된 대상 물질의 정성 및 정량적 분석을 짧은 시간에 염가로 처리할 수 있는 방법으로 대두되고 있다. 이런 목적으로 생산되는 진단용 칩에는 특정 질병이 발병했을 경우에 나타는 생의학적 표지 인자를 선별하여 이의 존재 여부를 판정하는 것을 목표로 하기 때문에 그 대상이 되는 질병의 진단에 대단히 중요하며 진단 현장에서 시의적

인 정보를 제공할 수 있다. 이러한 면역 검증기법에 사용되는 진단용 칩은 기존의 병리학적 검사 방법에 비하여 시간, 공간 및 절차를 대폭 간소화시키고 있다. 이러한 종래의 측방 유동 정량 검정 스트립들을 포함하는 칩들은 아직까지는 대부분이 정성적 분석의 테두리에 머물고 있다. 즉, 면역학적 반응의 결과를 눈으로 볼 수 있는 형태로 변환시켜 그 결과를 분석자가 주관적인 기준에 의하여 판정을 내리는 방식을 취하고 있다. 이 방법은 측정 기기가 소요되지 않는 편리성 때문에 보급이 빠른 편이다. 대표적인 것으로는 임신진단용 칩을 들 수 있다.

<45> 이런 경우 정밀 정성 또는 정량 분석기법이 사용되어야 하는데, 현재 이러한 고감도 분석 용도로 사용되는 대표적 기법은 분광기법 및 형광분석법이다. 형광을 검출하는 방법으로는 레이저 유발 형광 검출법(laser-induced fluorescence detection)이 대표적으로 이용되고 있다. 레이저 유발 형광 검출법은 형광물질이 흡수하는 파장의 들뜸 광원으로 레이저를 사용하여 형광물질을 여기 상태(excited state)로 만들고 다시 바닥 상태(ground state)로 이동되면서 나오는 형광의 세기를 측정하는 것이며 각 형광의 세기로부터 농도를 알 수 있다. 이러한 방법으로 DNA 또는 단백질 시료에 형광물질을 붙여 정량 분석을 할 수 있다.

<46> 여기에서, DNA 칩이란 기계 자동화와 전자 제어 등을 이용하여 적게는 수백 개부터 많게는 수십만 개의 DNA를 아주 작은 공간에 집어넣을 수 있게 만든 것이다. 다시 말해 DNA 칩은 유리, 실리콘 등의 투명 또는 반투명 재질로 된 작은 기판 위에 DNA를 결합시켜 유전자 발현 양상, 유전자 결합, 단백질 분포, 반응 양상 등을 분석해 낼 수 있는 생물학적 마이크로칩을 말한다. DNA 칩은 붙이는 유전물질의 크기에 따라 cDNA 칩과 올리고 뉴클레오타이드 칩으로 나눌 수 있다. cDNA 칩에는 최소한 500 bp 이상의 유전자(full-length open leading frame)가 붙여져 있고, 올리고뉴클레오타이드 칩에는 약 15 내지 25개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오타이드가 붙여져 있다.

<47> 표적 DNA를 이용한 DNA 칩의 제작 기술은 크게 기판 위에 올리고뉴클레오타이드를 직접 합성하는 방식과 합성 또는 증폭된 표적 DNA를 기판 위에 심는 방식으로 나뉜다. 전자는 반도체 칩을 제작하는 방식에서 유래된 포토리소그래픽(photolithographic) 방법을 이용한 것으로 고밀도 집적이 가능하지만 표적 DNA의 길이가 20개 뉴클레오타이드 내외로 제한된다. 질병의 진단 혹은 일염기 다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)의 연구 등에 적합하다. 후자인 DNA 칩은 차등 유전자 발현(differential gene expression)의 연구에 많이 응용되며 폴리-L-라이신, 아민 혹은 알데하이드로 코팅된 슬라이드 위에 표적 DNA를 심는다.

<48> 이러한 단백질 칩은 제법 또는 응용에 있어서 당업자에게 잘 알려져 있음은 물론 많은 과학전문지 및 특허 문헌에 다양하게 기술되어 있다. 예를 들면, 단백질 칩은 소형의 투명 또는 반투명 기판 위에 여러 질환에 관계되는 단백질에 대한 항체를 집적하고, 환자의 체액으로부터 준비한 분석물을 생화학적 마커로 하여 그 질환의 존재여부 및 진행상태를 조기에 진단한다. 상기 소형의 기판은 통상의 유리판 위에 아비딘(avidin) 등을 이용하여 원하는 단백질을 고착할 수 있다. 다른 방도로서, 폴리스티렌(polystyrene)을 기판 재질로 사용할 수 있으며 이러한 폴리스티렌 기판은 단백질 부착이 용이하고 부착효율도 좋다. 이외에도 기판에 부착하는 단백질의 성질에 따라 폴리염화비닐(polyvinylchloride) 및 폴리프로필렌(polypropylene)도 사용할 수 있다.

<49> 상술한 투명 또는 반투명 기판에 단백질을 집적하는 공정은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들면 폴리스티렌 기판을 사용하는 경우 가로 1.5cm, 세로 1.5cm 크기의 폴리스티렌 기판에 가로 1mm, 세로 2mm, 깊이 1.5 mm의 홈(groove) 8개를 1mm 간격으로 나란히 형성한다. 분석하고자 하는 단백질을 각각의 홈에 대략 직경 400nm, 간격 500nm로 하여 집적할 경우, 1cm 길

이에 10가지 종류의 단백질을 집적하는 것이 가능하다. 즉, 1개의 기판에 80여 종류의 단백질을 집적할 수가 있다.

<50> 한편, 레이저 유발 형광 검출법을 이용하여 형광을 검출하는 장치 중에서 가장 많이 사용되는 것은 공초점 레이저 주사 장치(confocal laser scanning system)이다. 이 장치는 레이저를 광원으로 이용하고 표본으로부터 발산된 형광 신호를 특수 광학계를 이용하여 시료상 한 위치에서 나오는 형광만을 광증배관(photomultiplier tube)으로 받아들인 후 디지털 영상으로 변환시키는 것이다.

<51> 즉, 도 10에 도시한 바와 같이, 공초점 레이저 주사 장치에서는 레이저 광원(11)을 사용하여 표본에 표지한 형광물질에 적합한 파장대의 빛만을 조사(excitation)하여 형광의 발광(emission)을 유도한다. 수십 마이크로 미터 크기의 면적에서 발광한 형광은 최종적으로는 광검출기(17) 앞에 위치한 공간필터(pinhole)(16)를 통하면서 형광점에서 발광한 형광만이 검출될 수 있도록 구성되어 있다. 미설명 부호 (12)는 입사광용 공간필터, (14)는 대물렌즈, (15)는 시료이다.

<52> 이러한 원리를 채용한 대부분의 형광 스캐너는 진단용 칩에서 발광되는 형광의 강도 및 공간적 분포에 대한 정보를 높은 신뢰도로 제공하고 있으나, 이 스캐너를 현장 진단용(POC, point of care)으로 사용하기에는 다음과 같은 어려움이 있다. 우선 이 종류의 스캐너는 최소한 \$50,000대의 가격대에서 공급되고 있어 편리한 진단칩의 확산 보급에 장애가 되고 있다. 또한 이들은 고감도의 검출능을 발휘하기 위해서는 주변 환경을 엄격하게 관리해야 하는 등 편의성을 염두에 두고 개발

된 제품이 아니라는 점이 있다. 이러한 탁상형 스캐너의 문제는 소형 스캐너를 이용하여 일부 보완할 수가 있어서, Biosite사는 Triage라는 이름의 소형 스캐너를 진단용 칩과 함께 심장병 표지인자용 Rapid 정량화 기기로 공급하고 있으나 가격이 국내 판매가 기준 50,000원/test 수준이 비교적 높게 책정되어 있다. 레이저 유발 표면형광 측정시스템과 이를 이용한 형광면역암 진단기와 가장 근접한 기술로는 Response Biomedical의 RAMP 모델이 있는데, 현 시점까지 제품은 출시되고 있지 않다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <53> 이와 같은 문제점을 감안하여 이루어진 본 발명은 레이저 유발 형광 검출법의 원리를 응용하여 질병의 표지가 되는 물질을 함유한 측방유동 검정용 칩에서 표지 물질이 입사되는 레이저광에 의하여 발광되는 형광을 검출하여 분석함으로써 해당 물질의 정량적 농도 및 공간적 분포를 확인할 수 있는 측방 유동 정량 검정 방법 및 이를 위한 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치 및 소형 스캐너를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <54> 본 발명의 또 다른 목적은 일선 병원에서 진단시점에서 바로 진단결과를 정량적으로 확인할 수 있고 특정 질환과 관련된 측방유동 검출식 바이오칩을 최적화함으로써 목표로 하는 표지인자의 검출에 특화된 성능을 발휘하도록 하는 소형의 측방 유동 정량 검정 방법 및 이를 위한 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치 및 소형 스캐너를 제공하는 것이다.
- <55> 본 발명의 또 다른 목적은 형광 면역크로마토그래피 방법으로 분석물의 농도를 측정하는데 있어 마우스 IgG 표준물질을 표준선에 고정하고 이 표준선을 검사선 앞에 배치하여 더욱 정확한 분석물의 정량화를 가능하게 하는 것이다.

- <56> 본 발명의 또 다른 목적은 전개막에 암과 관련되는 다수의 항체를 선으로 미세 배열하여 한번의 시료 분석을 통하여 여러 암표지 인자들을 동시에 분석할 수 있도록 하는 방법을 제공하는 것이다.
- <57> 본 발명의 또 다른 목적은 레이저광의 효율을 극대화하고 집광력의 증폭을 최대화하는 카트리지 하우징 윈도우 벽면의 각도를 설정하여 정확한 분석물의 농도를 측정하는 것이다.
- <58> 본 발명의 또 다른 목적은 은 또는 탐지자가 반응할 수 있는 은선(Ag line)을 시험선 뒤에 고정하여 후크이펙트(Hook effect)를 줄이고 검출범위를 넓히는 측방 유동 정량 검정 방법 및 이를 위한 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치 및 소형 스캐너를 제공하는 것이다.
- <59> 본 발명의 또 다른 목적은 스트립에 샘플이 투입된 후 일정 시간이 지난 다음에 판독을 하여 분석물의 농도를 정확하게 측정할 수 있는 측방 유동 정량 검정 방법 및 이를 위한 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치 및 소형 스캐너를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <60> 상기한 목적을 달성하기 위한 한 가지 관점으로서, 본 발명은 크로마토그래피 매질상의 한쪽 말단에 분석물이 함유된 것으로 예상되는 액체 시료를 적하하여 액체 시료가 크로마토그래피 매질을 통해 이동되도록 하고, 액체 시료 중의 분석물은 액체 시료가 적하된 구획으로부터 크로마토그래피 매질을 따라 전개하는 방향으로 일정한 간격을 두고 위치한 구획에 흡착되어 있는 표지된 탐지자와 반응하여 분석물-표지된 탐지자의 결합체를 형성하며, 분석물-표지된 탐지자의 결합체는 크로마토그래피 매질을 통해 이동하면서 상기 탐지자와 동일하거나 상이하며 비표지되어 상기 크로마토그래피 매질상의 중간 정도 위치에 설정된 검사창에 고정된 포획자와 반응함으로써 표지된 탐지자와 비표지된 포획자 사이에 분석물이 샌드위치로 포획되어 형

성된 표지된 탐지자-분석물-비표지된 포획자의 복합체를 형성하고, 이에 따라 형성된 복합체의 양을 측정하여 시료 중의 분석물을 결정하는 측방유동 정량 검정 방법에 있어서, 상기 표지된 탐지자는 형광물질로 표지되어 액체 시료중의 분석물과 반응하여 형광물질 표지된 탐지자-분석물의 결합체를 형성하고; 비표지된 포획자는 크로마토그래피 매질상의 검사창에 선으로 분주되어 크로마토그래피 매질을 따라 이동해 온 상기 결합체와 반응하여 형광물질 표지된 탐지자-분석물-비표지된 포획자의 복합체를 형성하고; 상기 형광물질 표지된 탐지자가 흡착되어 있는 크로마토그래피 매질상에, 상기 탐지자와 동일한 형광물질로 표지되고 상기 탐지자 및 포획자와 상이하며 액체 시료중의 표준물과 반응하는 표준 탐지자가 함께 흡착되어 있으며, 크로마토그래피 매질상의 검사창을 기준으로 전방에, 상기 형광물질 표지된 표준 탐지자와 반응하는 비표지된 표준 포획자가 표준선으로서 두개의 선으로 분주 고정되어 있어 액체 시료가 크로마토그래피 매질을 따라 이동하면서 형광물질 표지된 표준 탐지자-표준물-비표지된 표준 포획자의 표준 복합체를 형성하며; 상기 복합체 및 표준 복합체의 표면형광 매질에 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈로부터 입사하고 여기필터에 통과한 빛을 조사하여 이로부터 반사된 빛을 포집렌즈에 통과시켜 평행광을 형성하고, 이 평행광을 형광필터에 통과시켜 산란광을 걸러내고 순수한 형광성분만 집광렌즈로 입사시키고, 이 집광렌즈에 의해 순수한 형광 성분이 공간필터의 중심으로 집속되며, 상기 공간필터에서 평행광선 이외의 빛을 제거하고, 이 평행광선이 광검출기로 입사되며, 광검출기로 입사된 평행광선이 아날로그 디지털 컨버터(ADC)를 통해 CPU로 전달되어 상기 복합체의 형광 양을 상기 표준 복합체가 나타내는 표준 형광 양에 대하여 상대적으로 비교하여 분석물의 양을 결정하는 측방 유동 정량 검정 방법을 제공한다.

<61> 또한 상기 목적을 달성하기 위한 다른 관점으로서, 본 발명은 지지대(backing), 지지대의 한쪽 말단 상에 접착되어 있고 액체 시료가 투입되는 시료 패드(sample pad), 지지대의 다

른 쪽 말단 방향으로 시료 패드의 말단에 한쪽 말단이 겹쳐서 지지대에 접촉되어 있고 시료층의 분석물과 반응하여 복합체를 형성하는 표지된 탐지자가 비고정 흡착되어 있는 결합체 방출 패드(conjugate releasing pad), 지지대의 다른 쪽 말단 방향으로 표지된 결합체 방출 패드의 말단에 한쪽 말단이 겹쳐서 지지대에 접촉되어 있고 시료가 전개되며 방출 패드로부터 분리 이동하는 결합체와 샌드위치로 반응 포획하여 복합체를 형성하는 상기 탐지자와 동일하거나 상이한 포획자가 고정되어 있는 크로마토그래피 매질(chromatography medium) 및 크로마토그래피에 의해 이동하는 시료를 흡수하고 또한 표지된 미반응 물질을 흡수 및 제거하는 흡수패드(absorption pad)를 포함하는 측방 유동 정량 검정 스트립에 있어서, 상기 결합체 방출 패드상에 비고정적으로 흡착되어 있는 탐지자는 형광물질로 표지되어 있고, 추가로 상기 결합체 방출 패드상에는 상기 탐지자의 표지 형광물질과 동일한 형광물질로 표지되어 있고 액체시료층의 표준물과 반응하는 표준 탐지자가 비고정적으로 흡착되어 있으며; 상기 포획자는 크로마토그래피 매질상의 검사창에 선으로 분주 고정되어 있으며; 상기 탐지자 및 포획자와 상이하고 비표지된 표준 포획자가 상기 검사창의 전방에 표준선으로서 두개의 선으로 분주 고정되어 있고; 액체 시료가 크로마토그래피 매질을 따라 이동하면서 상기 검사창에서 형성된 형광물질 표지된 탐지자-분석물-포획자의 복합체 및 상기 표준선에서 형성된 형광물질 표지된 표준 탐지자-표준물-표준 포획자의 표준 복합체의 표면형광 매질은 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈로부터 입사하고 여기필터에 통과한 빛을 조사하여 이로부터 반사된 빛을 포집렌즈에 통과시켜 평행광을 형성하고, 이 평행광을 형광필터에 통과시켜 산란광을 걸러내고 순수한 형광성분만 집광렌즈로 입사시키고, 이 집광렌즈에 의해 순수한 형광 성분이 공간필터의 중심으로 집속되며, 상기 공간필터에서 평행광선 이외의 빛을 제거하고, 이 평행광선이 광검출기로 입사되며, 광검출기로 입사된 평행광선이 아날로그 디지털 컨버터(ADC)를 통해 CPU로 전달되어 상기 복합체의

형광 양을 상기 표준 복합체가 나타내는 표준 형광 양에 대하여 상대적으로 비교하여 분석물의 양을 결정하기 위한 스트립을 제공한다.

<62> 또한 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 관점으로서, 본 발명은 (i) 지지대(backing), 지지대의 한쪽 말단 상에 접착되어 있고 액체 시료가 투입되는 시료 패드(sample pad), 지지대의 다른 쪽 말단 방향으로 시료 패드의 말단에 한쪽

말단이 겹쳐서 지지대에 접촉되어 있고 시료층의 분석물과 반응하여 복합체를 형성하는 표지된 탐지자가 비고정 흡착되어 있는 결합체 방출 패드(conjugate releasing pad), 지지대의 다른 쪽 말단 방향으로 표지된 결합체 방출 패드의 말단에 한쪽 말단이 겹쳐서 지지대에 접촉되어 있고 시료가 전개되며 방출 패드로부터 분리 이동하는 결합체와 샌드위치로 반응 포획하여 복합체를 형성하는 상기 탐지자와 동일하거나 상이한 포획자가 고정되어 있는 크로마토그래피 매질(chromatography medium) 및 크로마토그래피에 의해 이동하는 시료를 흡수하고 또한 표지된 미반응 물질을 흡수 및 제거하는 흡수패드(absorption pad)를 포함하고; 상기 결합체 방출 패드상에 비고정적으로 흡착되어 있는 탐지자는 형광물질로 표지되어 있고, 추가로 상기 결합체 방출 패드상에는 상기 탐지자의 표지 형광물질과 동일한 형광물질로 표지되어 있고 액체시료층의 표준물과 반응하는 표준 탐지자가 비고정적으로 흡착되어 있으며; 상기 포획자는 크로마토그래피 매질상의 검사창에 선으로 분주 고정되어 있으며; 상기 탐지자 및 포획자와 상이하고 비표지된 표준 포획자가 상기 검사창의 전방에 표준선으로서 두개의 선으로 분주 고정되어 있는 스트립과; (ii)상기 스트립이 장착되고 하우징의 상판에 샘플 투입구와 경사진 벽면을 형성하고 있는 윈도우를 가지는 카트리지와; (iii)레이저, 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈, 여기필터, 포집렌즈, 형광필터, 집광렌즈, 공간필터, 광검출기, 아날로그 디지털 컨버터(ADC) 및 CPU로 구성되고, 이들 구성 요소들은 액체 시료가 상기 스트립의 크로마토그래피 매질을 따라 이동하면서 상기 검사창에서 형성된 형광물질 표지된 탐지자-분석물-포획자의 복합체 및 상기 표준선에서 형성된 형광물질 표지된 표준 탐지자-표준물-표준 포획자의 표준 복합체의 표면형광 매질이 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈로부터 입사하고 여기필터에 통과한 빛을 조사하여 이로부터 반사된 빛을 포집렌즈에 통과시켜 평행광을 형성하고, 이 평행광을 형광필터에 통과시켜 산란광을 걸러내고 순수한 형광성분만 집광렌즈로 입사시키고, 이 집광렌즈에 의해

순수한 형광 성분이 공간필터의 중심으로 집속되며, 상기 공간필터에서 평행광선 이외의 빛을 제거하고, 이 평행광선이 광검출기로 입사되며, 광검출기로 입사된 평행광선이 아날로그 디지털 컨버터(ADC)를 통해 CPU로 전달되도록 배치되어 있는 레이저 유발 표면형광 검출 장치가, 상기 스트립상에 형성된 상기 복합체의 형광 양 및 상기 표준 복합체의 표준 형광 양이 상기 레이저-유발 표면형광 검출 장치에 의해 측정되고 상대적으로 비교되어 액체 시료중의 분석물 양을 결정할 수 있도록, 일체로 구성된 분석물 정량 소형 스캐너를 제공한다.

<63> 본원에서 용어 '감도(sensitivity)'는 포획자, 탐지자와 분석물의 복합체를 검출할 수 있는 최소 한계량을 의미한다.

<64> 본원에서 용어 '표면형광(epifluorescence)'은 크로마토그래피를 이용한 측방 유동 검정 스트립(lateral flow assay strip)의 검사창 및 표준선에 각각 고정되는 형광물질 표지된 탐지자-분석물-포획자의 복합체 및/또는 형광물질 표지된 표준 탐지자-표준물-표준 포획자의 표준 복합체로부터 발광되는 형광을 가리킨다.

<65> 본원에서 용어 '분석물(analyte)'은 액체 시료중의 분석 대상 화합물 또는 조성물을 가리킨다. 본 발명에서 사용될 수 있는 시료는 상기 분석물을 함유하는 어떠한 시료로부터도 선택될 수 있으며, 예로는 뇨, 혈청, 혈장, 혈액, 타액, 척수

액, 안구액, 양수 등과 같은 생리학적 유액, 밀크 및 와인과 같은 식품, 음식물 폐수와 같은 화학적 처리 스트림 등이 포함된다. 본 발명에서 검사될 수 있는 분석물은 완전 항원과 합텐(불완전 항원)으로 구분될 수 있다. 여기서, 완전 항원은 자체로서 항체 생성을 유도할 수 있는 능력(면역원성)을 갖는 항원성 물질을 가리키며 주로 고분자량의 펩타이드 호르몬을 포함한다. 상기 합텐은 항체와 결합할 수 있으나 자체로서는 항체 생성을 유도하는 능력이 없는 물질을 가리키며 비교적 작은 분자량(약 1,000 미만의 분자량)의 펩타이드를 포함한다. 합텐은 예를 들면 소 혈청 알부민과 같은 단백질에 결합될 때 항체 생성능을 획득한다.

<66> 본 발명에 있어서, 완전 항원은 이들로 한정되는 것은 아니지만 다음 같은 것을 포함한다:

<67> (1) 펩타이드 호르몬의 예

<68> 1) 성장 호르몬(GH), 부신피질자극 호르몬(ACTH), 멜라닌세포자극 호르몬(MSH), 프롤락틴, 갑상선-자극 호르몬(TSH), 황체형성 호르몬(LH), 여포자극 호르몬(FSH) 및 옥시토신과 같은 뇌하수체 호르몬;

<69> 2) 칼시토닌 및 부갑상선 호르몬과 같은 칼슘 대사 조절 호르몬;

<70> 3) 인슐린, 프로인슐린 및 췌장 호르몬;

<71> 4) 가스트린 및 세크레틴과 같은 소화관 호르몬;

<72> 5) 안지오텐신 및 브라디키닌과 같은 혈관에 작용하는 호르몬;

<73> 6) 사람 융모성성생식선자극 호르몬(hCG) 및 사람 태반 락토젠(hPL)과 같은 태반

호르몬;

<74> (2) 다른 물질의 예

<75> 1) 전립선 산성 포스파타제(PAP), 전립선-특이 항원(PSA), 알카리성 포스파타제, 트랜스아미나제, 락트산 데하이드로게나제(LDH), 트랜스아미나제, 트립신 및 펩시노겐과 같은 효소;

<76> 2) α -펩토프로테인(AFP) 및 암태아성 항원(CEA)과 같은 암-특이 물질;

<77> 3) 면역글로불린 G(IgG), 피브린-피브리노겐 분해 산물(FDP, D-이량체), 안티트롬빈 III(ATIII) 및 트랜스페린과 같은 혈청 단백질 성분;

<78> 4) 류마티스성 인자, 세로토닌, 우로키나제, 페리틴 및 물질 P와 같은 물질.

<79> 본 발명에 있어서, 합텐으로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 다음 같은 것이 포함된다:

<80> (1) 스테로이드성 합텐

<81> 1) 에스트론, 에스트라디올, 에스트리올, 에스테트롤, 에컬린 및 에컬레닌과 같은 에스트로젠;

<82> 2) 프로제스테론, 프레그나네디올, 프레그나네트리올, 19-노레티스테론 및 클로로마디논 아세테이트와 같은 천연 또는 합성 루테오토크론(luteohormones);

<83> 3) 테스토스테론, 데하이드로에피안드로스테론, 디하이드로테스토스테론, 안드로스테론 및 에티오키라노론과 같은 남성 호르몬;

<84> 4) 코르티솔, 코르티손, 데옥시코르티코스테론, 알도스테론 및 테트라하이드로코르티솔과 같은 부신피질 호르몬;

- <85> 5) 비타민 D, 콜레스테롤, 콜린산, 데옥시콜린산 및 케노콜린산(chenocholic acid) 및 기타 스테로이드(예, 카르디오톤 스테로이드, 사포닌 및 사포제닌).
- <86> (2) 생리학적 활성 아민
- <87> 1) 에피네프린, 노레피네프린, 도파민 및 에페드린 및 이들의 대사물과 같은 카테콜아민 ;
- <88> 2) 모르핀, 코데인, 헤로인, 모르핀 클로라이드, 코카인, 메스칼린, 파파베린, 나르코틴 , 요힘빈(yohimbine), 레세르핀, 에르고타민 및 스트리키닌(strychnine)과 같은 생리학적 활성 알칼로이드;
- <89> 3) LSD, 암페타민, 메탄페타민 및 메프로바메이트와 같은 아미노 기-함유 향정신제.
- <90> (3) 다른 예
- <91> 1) TRH 및 LH-RH와 같이 항원성이 없는 저분자량 펩타이드;
- <92> 2) 디요오도티로닌, 트리요오도티로닌 및 티록신과 같은 갑상선 호르몬;
- <93> 3) 프로스타글란딘 E2, 프로스타글란딘 E3 및 프로스타글란딘 F1a과 같은 프로스타글란딘 ;
- <94> 4) 비타민 A, 비타민 B(비타민 B1, B2, B6 및 B12 등), 비타민 E 및 비타민 K와 같은 비타민 ;
- <95> 5) 페니실린, 악티노마이신, 클로로마이세틴 및 테트라사이클린과 같은 항생물질;
- <96> 6) 유기체내로 투여되는 기타 생체내 성분 및 약물 및 이들의 대사물.

- <97> 본 발명에 있어서, 분석물은 단일 결합 부위(일가)(monoepitopic) 리간드 또는 복수 결합 부위(다가)(polyepitopic) 리간드로서 특정될 수 있다. 다가 리간드 분석물은 보통 폴리(아미노산), 즉 폴리펩타이드 및 단백질, 다당류, 핵산 및 이들의 조합물이다. 여기서 조합물은 세균, 바이러스, 염색체, 유전자, 미토콘드리아, 핵, 세포막 등을 포함한다. 대부분의 경우, 본 발명에서 검정되는 다가 리간드 분석물은 분자량이 보통 약 5,000 이상, 더욱 보통은 약 10,000 이상이다. 폴리(아미노산) 카테고리에서 관심의 대상인 폴리(아미노산)의 분자량은 일반적으로 약 5,000 내지 5,000,000, 더욱 보통은 약 20,000 내지 1,000,000이다. 호르몬중에서 관심의 대상인 것은 보통 분자량이 약 5,000 내지 60,000이다.
- <98> 본 발명에 있어서의 분석물로서 여러 단백질은 유사한 구조 특징을 갖는 단백질 부류, 특정한 생물학적 기능을 갖는 단백질 부류, 특정 미생물, 특히 발병 미생물과 연관된 단백질 부류 등으로서 고려될 수 있다. 세포 및 바이러스의 경우, 조직적합성 항원 또는 표면 항원이 흔히 관심의 대상이다.
- <99> 구조와 연관된 단백질은 프로타민, 히스톤, 알부민, 글로불린, 경단백질(scleroproteins), 인단백질(phosphoproteins), 뮤코단백질, 색소단백질(chromoproteins), 지단백질(lipoproteins), 핵단백질, 당단백질 및 프로테오글리칸로 분류될 수 있으며 기타 미분류된 단백질로 예를 들면 소마토트로핀, 프롤락틴, 인슐린, 펩신 등이 있다. 이들 모두는 본 발명에 따른 측방 유동 검정 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치가 일체로 구성된 소형 스캐너(본원에서 본 발명 소형 스캐너로 약칭될 수 있다)로 정량될 수 있다.
- <100> 사람 혈장에서 발견되는 많은 단백질이 임상학적으로 중요하며 이들 모두는 본 발명에 따른 측방 유동 검정 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치가 일체로 구성된 소형 스캐너

로 정량할 수 있다. 이러한 혈장 단백질의 예로는 프리알부민, 알부민 $\alpha 1$ -지단백질, $\alpha 1$ -산
 당단백질, $\alpha 1$ -안티트립신 및 $\alpha 1$ -당단백질, 트랜스코르틴, 4,6S-포스트알부민, 트립토판-불량
 $\alpha 1$ -당단백질 및 $\alpha 1X$ -당단백질, 티록신-결합 글로불린, 인터- α -트립신-억제제, Gc-글루볼린
 (Gc 1-1, Gc 2-1 및 Gc 2-2), 합토글로불린(Hp 1-1, Hp 2-1 및 Hp 2-2), 세룰로플라스민, 콜린
 에스테라제 $\alpha 2$ -지단백질, 마이오글로빈, C-반응성 단백질 $\alpha 2$ -마크로글로불린, $\alpha 2$ -HS-당단
 백질, Zn- $\alpha 2$ -당단백질 및 $\alpha 2$ -뉴라미노-당단백질, 에리쓰로포이에틴 β -당단백질,
 트랜스페린, 헤모팩신, 피브리노겐, 플라스미노겐 $\beta 2$ -당단백질 I 및 $\beta 2$ -당단백질 II, 면역글
 로불린 G(IgG), A(IgA), M(IgM), D(IgD), E(IgE) 등을 들 수 있다.

<101> 본 발명 소형 스캐너를 사용하여 정량할 수 있는 분석물의 또 다른 예는 보체 인자 및
 혈액응고 인자이다. 보체 인자는 C'1, C'1q, C'1r, C'1s, C'2, C'3($\beta 1A$ 및 $\alpha 2D$), C'4, C'5,
 C'6, C'7, C'8 및 C'9를 포함한다. 중요한 혈액응고 인자는 피브리노겐, 프로트롬빈, 트롬빈,
 조직 트롬보플라스틴, 프로아셀레린, 프로아셀레린 촉진 글로불린, 항호혈액성 글로불린(AHG),
 크리스마스 인자(혈장 트롬보플라스틴 성분), 스튜아트-프로워 인자(오토프로트롬빈 III),
 혈장 트롬보플라스틴 선조(plasma thromboplastin antecedent), 하지만 인자(Hagemann 인자),
 피브리린-안정화 인자를 포함한다.

<102> 본 발명 소형 스캐너를 사용하여 정량할 수 있는 중요한 단백질 호르몬으로는 이들로 한
 정되는 것은 아니지만 부갑상선 호르몬(파라트롬빈), 티로칼시토닌, 인슐린, 글루카곤,
 렐락신, 에리쓰로포이에틴, 멜라노트로핀, 소마토트로핀(성장 호르몬), 코르티코트로핀, 티로
 트로핀, 여포자극호르몬, 황체형성호르몬, 루테오마모항성 호르몬, 고나도트로핀(융모 고나도
 트로핀)과 같은 펩타이드 및 단백질 호르몬; 세크레틴, 가스트린, 안지오텐신 I 및 II, 브라디
 키닌(Bradykinin), 사람 태반 락토젠과 같은 조직 호르몬; 옥시토신, 바소프레신, 방출인자

(CRF, LRF, TRF, 소마토트로핀-RF, GRF, FSH-RF, PIF, MIF)와 같은 뇌하수체로부터 유도된 펩타이드 호르몬이 포함된다.

.103> 본 발명 소형 스캐너를 사용하여 정량할 수 있는 분석물로서 미생물로부터 유도된 항원성 다당류는 이들로 한정되는 것은 아니지만 스트렙토코커스 파이오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 다당류, 디플로코커스 뉴모니아(*Diplococcus pneumoniae*) 다당류, 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*) 다당류, 나이세리아 고노르헤애(*Neisseria gonorrhoeae*) 다당류, 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*) 다당류, 액티노바실러스 말레이(*Actinobacillus mallei*) 조추출물, 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*) 지다당류 및 다당류, 파스퇴렐라 페스티스(*Pasteurella pestis*) 다당류, 파스퇴렐라 몰토시다(*Pasteurella multocida*) 캡슐 항원, 브루셀라 아보르투스(*Brucella abortus*) 조추출물, 해모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 다당류, 해모필루스 페르투스(*Haemophilus pertussis*) 조추출물, 트레포네마 레이테리(*Treponema reiteri*) 다당류, 베일로넬라(*Veillonella*) 지다당류, 에리시펠로트릭스(*Erysipelothrix*) 다당류, 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*) 다당류, 크로모박테리움(*Chromobacterium*) 지다당류, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 90% 페놀-추출된 균주의 염수 추출물 및 다당류 분획, 크렙시엘라 에어로게네스(*Klebsiella aerogenes*) 다당류, 크렙시엘라 클로아케(*Klebsiella cloacae*) 다당류, 살모넬라 타이포사(*Salmonella typhosa*) 지다당류 및 다당류, 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 다당류, 쉬겔라 다이센테리아(*Shigella dysenteriae*) 다당류, 쉬겔라 플렉네리(*Shigella flexneri*) 및 쉬겔라 소네이(*Shigella sonnei*)의 조추출 및 다당류, 리케치아(*Rickettsiae*) 조추출물, 캔디다 알비칸스(*Candida*

albicans) 다당류 및 엔타모에바 히스톨라이티카(*Entamoeba histolytica*) 조추출물에서 발견되는 헤모센시틴(hemosensitin)을 포함한다.

104> 본 발명 소형 스캐너를 사용하여 정량하는 미생물은 완전한 균체이거나 용해, 분쇄 또는 단편화될 수 있으며 미생물의 예로는 코리네박테리아(*Corynebacteria*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diptheriae*), 뉴모코씨(*Pneumococci*), 디플로코쿠스 뉴모니아(*Diplococcus*

pneumoniae), 스트렙토쿠씨(Streptococci), 스트렙토코쿠스 파이오게네스(Streptococcus
 pyogenes), 스트렙토코쿠스 살리바루스(Streptococcus salivarius), 스타필로코씨
 (Staphylococci), 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 스타필로코쿠스 알버스
 (Staphylococcus albus), 나이세리아(Neisseriae), 나이세리아 메닌자이티디스(Neisseria
 meningitidis), 나이세리아 고노르헤(Neisseria gonorrhoeae), 엔테로박테리아씨아
 (Enterobacteriaceae), 에스체리치아 콜라이(Escherichia coli), 에어로박터 에어로게네스
 (Aerobacter aerogenes), 크렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae), 살모넬라 타이포사
 (Salmonella typhosa), 살모넬라 콜레라슈스(Salmonella choleraesuis), 살모넬라 타이피뮤리
 움(Salmonella typhimurium), 쉬겔라 다이센테리아(Shigella dysenteriae), 쉬겔라 슈미트지
 (Shigella schmitzii), 쉬겔라 아라비노타다(Shigella arabinotarda), 쉬겔라 플렉스너리
 (Shigella flexneri), 쉬겔라 보이디(Shigella boydii), 쉬겔라 소니(Shigella Sonnei), 프로
 테우스 불가리스(Proteus vulgaris), 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis), 프로테우스
 모가니(Proteus morgani), 슈도모나스 애루기노사(Pseudomonas aeruginosa), 알카리제네스 패
 칼리스(Alcaligenes faecalis), 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae), 헤모필루스 인플루엔자
 (Hemophilus influenzae), 헤모필루스 두크레이(H. ducreyi), 헤모필루스 헤모필루스(H.
 hemophilus), 헤모필루스 애집티쿠스(H. aegypticus), 헤모필루스 파라인플루엔자(H.
 parainfluenzae), 보디텔라 페투씨스(Bordetella pertussis), 파스퇴렐라 페스티스
 (Pasteurella pestis), 파스퇴렐라 툴라루시스(Pasteurella tularensis), 브루셀라 메리텐시스
 (Brucella melitensis), 브루셀라 아보투스(Brucella abortus), 브루셀라 슈이스(Brucella
 suis), 바실러스 앤쓰라시스(Bacillus anthracis), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis),
 바실러스 메가테리움(Bacillus megaterium), 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 크로스리디

움 테타니(*Clostridium tetani*), 크로스리디움 펄프리젠스(*Clostridium perfringens*), 크로스리디움 노비(*Clostridium novyi*), 크로스리디움 셉티쿰(*Clostridium septicum*), 크로스리디움 히스토리티쿰(*Clostridium histolyticum*), 크로스리디움 터티움(*Clostridium tertium*), 크로스리디움 바이퍼멘탄스(*Clostridium bifermentans*), 크로스리디움 스포로제네스(*Clostridium sporogenes*), 마이코박테리움 튜버쿨로시스 호미니스(*Mycobacterium tuberculosis hominis*), 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*), 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 레프라(*Mycobacterium leprae*), 마이코박테리움 파라튜버쿨로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*), 액티노마이시스 이스라엘리(*Actinomyces israelii*), 액티노마이시스 보비스(*Actinomyces bovis*), 액티노마이시스 내슬루디(*Actinomyces naeslundii*), 노카디아 아스티로이디스(*Nocardia asteroides*), 노카디아 브라질리엔시스(*Nocardia brasiliensis*), 스피로케츠 강(*Spirochetes*), 트레포네마 펠리둠 스파이럴움 미누스(*Treponema pallidum Spirillum minus*), 트레포네마 펠티뉴 스트렙토바질루스(*Treponema pertenue Streptobacillus*), 트레포네마

카라툼(*Treponema carateum*), 보렐리아 리큐렌티스(*Borrelia recurrentis*), 램토스피라 익테로
 헤모하지아(*Leptospira icterohemorrhagiae*), 램토스피라 캐니콜라(*Leptospira canicola*), 마
 이코프라즈마(*Mycoplasmas*), 마이코프라즈마 뉴모니아(*Mycoplasma pneumoniae*), 리스테이라 모
 노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 에리시펠로트릭스 류시오파시아(*Erysipelothrix*
rhusiopathiae), 스트렙토바실루스 모닐리포미스(*Streptobacillus moniliformis*), 돈바니아 그
 래놀로마티스(*Donvania granulomatis*), 바토넬리아 바질리포미스(*Bartonella bacilliformis*),
 리케차 프로와제키(*Rickettsia prowazekii*), 리케차 무세리(*Rickettsia mooseri*), 리케차 리케
 치(*Rickettsia rickettsii*), 리케차 코노리(*Rickettsia conori*), 리케차 오스트렐리스
 (*Rickettsia australis*), 리케차 시비리쿠스(*Rickettsia sibiricus*), 리케차 아카리
 (*Rickettsia akari*), 리케차 투투가무시(*Rickettsia tsutsugamushi*), 리케차 버네티
 (*Rickettsia burnetii*), 리케차 키타나(*Rickettsia quintana*), 클라미디아(*Chlamydia*), 크립토
 코쿠스 네오포만스(*Cryptococcus neoformans*), 브라스토마이시스 더마티디스(*Blastomyces*
dermatidis), 히스토프라즈마 캡슐리툼(*Histoplasma capsulatum*), 코시디오이디스 이미티스
 (*Coccidioides immitis*), 파라코시디오이디스 브라질리시스(*Paracoccidioides brasiliensis*),
 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 에스페르길러스 퓨미게터스(*Aspergillus fumigatus*), 뮤
 코 코림비퍼(*Mucor corymbifer*) (*Absidia corymbifera*), 리조퍼스 오리재(*Rhizopus oryzae*),
 리조퍼스 아리저스(*Rhizopus arrhizus*), 리조퍼스 니그리칸스(*Rhizopus*

nigricans), 스포로트리썸 스펜치(*Sporotrichum schenkii*), 폰세케아 페드로소이(*Fonsecaea pedrosoi*), 폰세케아 콤팩타(*Fonsecaea compacta*), 폰세케 더마티디스(*Fonsecae dermatidis*), 클라도스포리움 캐리오니(*Cladosporium carrionii*), 피알로포라 베르코사(*Phialophora verrucosa*), 에스페르길러스 니더랜스(*Aspergillus nidulans*), 마듀렐라 미세토미(*Madurella mycetomi*), 마듀렐라 그리세아(*Madurella grisea*), 알레스케리아 보이디(*Allescheria boydii*), 피알로스포라 진실메이(*Phialosphora jeansilmei*), 마이크로스포룸 갠섬(*Microsporum gypseum*), 트라이코피톤 멘타그로피테스(*Trichophyton mentagrophytes*), 케라티노미세스 아젤로이(*Keratinomyces ajelloi*), 마이크로스포룸 캐니스(*Microsporum canis*), 트라이코피톤 루브룸(*Trichophyton rubrum*), 마이크로스포룸 애드뉴이니(*Microsporum adnouini*), 아데노바이러스(*Adenoviruses*), 헤르페스 바이러스(*Herpes Viruses*), 헤르피스 심플렉스(*Herpes simplex*), 바리셀라(*Varicella*), 헤르페스 조스터(*Herpes Zoster*), 사이토메갈로바이러스(*Cytomegalovirus*), 천연두 바이러스(*Pox Viruses*), 바리올라(*Variola*), 백신니아(*Vaccinia*), 폭스바이러스 보비스(*Poxvirus bovis*), 파라백시니아(*Paravaccinia*), 몰루스쿰 콘타지오썸(*Molluscum contagiosum*), 피카오르나바이러스(*Picaornaviruses*), 폴리오바이러스(*Poliovirus*), 콕사키바이러스(*Coxsackievirus*), 에코바이러스(*Echoviruses*), 리노바이러스(*Rhinoviruses*), 믹소바이러스(*Myxoviruses*), 인플루엔자(*Influenza*) A, B 및 C, 파라인플루엔자(*Parainfluenza*) 1-4, 유행성 이하선염 바이러스(*Mumps Virus*), 뉴

캐슬병 바이러스(Newcastle Disease Virus), 홍역 바이러스(Measles Virus), 우역 바이러스(Rinderpest Virus), 개 디스탬퍼 바이러스(Canine Distemper Virus), RS 바이러스(Syncytial Virus), 루벨라 바이러스(Rubella Virus), 아르보바이러스(Arboviruses), 동양 말 뇌염 바이러스(Eastern Equine Encephalitis Virus), 서양 말 뇌염 바이러스(Western Equine Encephalitis Virus), 신드비스 바이러스(Sindbis Virus), 치쿠건야 바이러스(Chikugunya Virus), 쉼리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest Virus), 마요라 바이러스(Mayora Virus), 세인트 루이스 뇌염 바이러스(St. Louis Encephalitis Virus), 캘리포니아 뇌염 바이러스(California Encephalitis Virus), 콜로라도 진드기 열 바이러스(Colorado Tick Fever Virus), 황달 바이러스(Yellow Fever Virus), 뎅그열 바이러스(Dengue Virus), 1 내지 3형 레오바이러스(Reoviruses), A형 간염 바이러스(Hepatitis A Virus), B형 간염 바이러스(Hepatitis B Virus), 종양 바이러스(Tumor Viruses), 라우스커 백혈병 바이러스(Rauscher Leukemia Virus), 그로스 바이러스(Gross Virus), 말로니 백혈병 바이러스(Maloney Leukemia Virus), 엡스타인 바르 바이러스(Epstein Barr Virus), 개 심장 기생충(microfilaria), 말라리아균(Malaria), 주혈흡충증균(Schistosomiasis), 콕시디아증균(Coccidiosis) 및 선모충병균(Trichinosis)을 들 수 있다.

<105> 본 발명 소형 스캐너를 사용하여 정량할 수 있는 일가 리간드 분석물은 일반적으로 분자량이 약 100 내지 2,000이고, 더욱 보통은 125 내지 1,000이다. 중요한 분석물로는 약물, 대사물, 살충제, 오염물 등이 포함된다. 중요한 약물로서는

알카로이드가 포함된다. 알카로이드의 예로는 모르핀 알카로이드(예, 모르핀, 코데인, 헤로인, 렉스트로메토르판, 이들의 유도체 및 대사물), 코카인 알카로이드(예, 코카인 및 벤조일 엑고닌, 이들의 유도체 및 대사물), 맥각 알카로이드(예, 리세르그산의 디에틸아미드), 스테로이드 알카로이드, 아미나졸릴 알카로이드, 퀴나졸린 알카로이드, 이소퀴놀린 알카로이드, 퀴놀린 알카로이드(예, 퀴닌 및 퀴니딘), 디테르펜 알카로이드, 이들의 유도체 및 대사물을 들 수 있다.

<106> 본 발명 소형 스캐너로 정량할 수 있는 분석물로는 스테로이드 계통의 약물이 포함된다. 이의 예로는 에스트로겐, 안드로겐, 안드로오피질 스테로이드, 담즙산, 강심성 글리코시드 및 아글리콘(예, 디곡신 및 디곡시제닌, 사포닌 및 사포제닌, 이들의 유도체 및 대사물)을 들 수 있다. 또한, 디에틸스틸베스트롤과 같은 스테로이드 모사 물질이 포함된다. 또 다른 약물로는 5 내지 6개의 환원을 갖는 락탐이 포함되고, 이의 예로는 바르비투레이트(예, 페노바르비탈 및 세코바르비탈), 디페닐하이단토닌, 피리미돈, 에토숙시미드 및 이들의 대사물을 들 수 있다. 또 다른 약물로는 알킬의 탄소수가 2개 또는 3개인 아미노알킬벤젠이 포함되고, 이의 예로는 암페타민, 카테콜아민(예, 에페드린), L-도파, 에피네프린, 나르신, 파파베린 및 이들의 대사물을 들 수 있다. 또 다른 약물로는 헤테로사이클릭 환이 아제핀, 디아제핀 및 페노티아진인 벤즈헤테로사이클릭이 포함되고, 이의 예로는 옥사제팜, 클로르프로마진, 테그레톨, 이미프라민, 이들의 유도체 및 대사물을 들 수 있다. 또 다른 약물로는 퓨린이 포함되고 이의 예로는 테오필린, 카페인, 이들의 대사물 및 유도체를 들 수 있다. 또 다른 약물로는 마리쥬아나로부터 유도된 물질이 포함

되고 이의 예로는 카나비놀 및 테트라하이드로카나비놀을 들 수 있다. 또 다른 약물로는 A, B(에, B12), C, D, E, K, 엽산 및 티아민과 같은 비타민이 포함된다. 또 다른 약물로는 하이드록실화 및 불포화의 정도 및 부위에 의해 상이하게 나타나는 프로스타글란딘이 포함된다. 또 다른 약물로는 항생물질이 포함되고, 이의 예로는 페니실린, 클로로마이세틴, 안티노마이세틴, 테트라사이클린, 테라마이신, 이들의 대사물 및 유도체를 들 수 있다. 또 다른 약물로는 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드가 포함되고, 이의 예로는 적절한 당과 포스페이트 치환체를 갖는 ATP, NAD, FMN, 아데노신, 구아노신, 티미딘 및 시티딘을 들 수 있다. 또 다른 약물로는 분류될 수 없는 기타 개개 약물을 들 수 있는데 예를 들면 메타돈, 메프로바메이트, 세로토닌, 메페리딘, 아미트리프틸린, 노르트립틸린, 리도카인, 프로카인아미드, 아세틸프로카인아미드, 프로프라놀롤, 그리세오폴빈, 발프로산, 부티로페논, 항히스타민, 항콜린성 약물(예, 아트로핀), 이들의 대사물 및 유도체가 포함된다. 질병 상태로 연관된 대사물로는 스페르민, 갈락토스, 페닐피루브산 및 1형 포르피린이 포함된다. 또 다른 약물로는 아미노글리코사이드이 포함되고 이의 예로는 젠타마이신, 카나마이신, 토브라마이신 및 아미키신을 들 수 있다.

<107> 본 발명에서 정량될 수 있는 분석물로서는 살충제를 들 수 있으며 이의 예로는 폴리할로젠화 바이페닐, 포스페이트 에스테르, 티오포스페이트, 카르바메이트, 폴리할로젠화 설펜아미드, 이들의 대사물 및 유도체를 들 수 있다.

<108> 본 발명 소형 스캐너를 사용하여 정량할 수 있는 분석물로는 수용체 분석물이 있다. 이의 경우 분자량은 일반적으로 10,000 내지 2×10^8 이고, 더욱 보통은

10,000 내지 106이다. 면역글로불린 IgA, IgG, IgE 및 IgM의 경우, 분자량은 일반적으로 약 160,000 내지 약 106이다. 효소는 보통 분자량이 약 10,000 내지 1,000,000이다. 천연 수용체는 분자량이 아주 다양하며, 일반적으로, 약 25,000 이상이며 106 이상일 수 있고, 예를 들면 아비딘, DNA, RNA, 티록신 결합 글로불린, 티록신 결합 프리알부민, 트랜스크로틴 등이 포함된다.

109> 상기된 분석물 외에도, 본 발명 소형 스캐너는 종양 마커, 맥관형성 연관된 마커, 심장병 마커, 알츠하이머병 연관된 마커, 암 연관된 유전자, 환경 독소, 남용 약물 등을 정량하는데 사용할 수 있다. 종양 마커로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 알파 1-애시드글리코프로테인, CEA, AFP, PSA/유리 PSA, CA 15-3, CA 19-9, CA 27-9, CA 50, CA 125, CA 72-4, 칼시토닌, 엘라스타제-1, 페리틴, 펩시노젠 I, PIVKA II, 프로콜라겐 III 펩타이드, 베타 HCG, 베타 2-마이크로블로블린, 뉴우론 특이적 에놀라제, CYFRA 21-1(사이코케라틴 19), 세크레틴, NMP(핵 매트릭스 단백질), COX-1 및 TPA(조직 폴리펩타이드 항원)이 포함된다. 맥관형성 관련된 마커는 혈관형성 인자 및 지혈인자를 포함한다. 혈관형성 인자의 예로는 aFGF(산성 섬유아세포 성장인자), bFGF(염기성 섬유아세포 성장인자), VEGF(혈관내피 성장인자), 안지오텐신, 안지오텐신 II, 헤파리나제, 산란 인자(scatter factor), HGF(간세포 성장인자), PDGF(혈소판 파생 성장인자), 플레이오토로핀, TGF 알파, TGF 베타, IL-8, TNF 알파 및 프로스타글란딘 E1 및 E2를 들 수 있다. 지혈 인자의 예로는 엔도스타틴, 안지오텐신 II, 연골 파생 억제제, 헤파리나제, 안지오텐신 II, IFN 알파, IFN 베타, IFN 감마, 혈소판 인자 4, 16kDa 프로락틴 단편, 프로타민, 쓰롬보스판딘, TIMP(메탈로프로테이나제의 조직 억제제), 탈리도미드(thalidomide), TNP470(푸마질린 유사체)를 들 수 있다. 심장병 마커의 예로는 크레아틴 키나제-BB, 크레아틴 키나제-MB, 크레아틴 키나제-MM, 마이오글로빈, MLC(마이오신 경쇄), 트로포

닌 I, 트로포닌 C, 트로포닌 ITC, 트로포닌 T, CRP, FABP(지방산 결합 단백질)을 들 수 있다. 알츠하이머병 연관된 마커의 예로는 글루타민 신세포제, 멜라노 트랜스페린, 베타-아밀로이드 단백질을 들 수 있다. 암 연관된 유전물질의 예로는 bcl-2, C-erbB-2, C-myc, CSF-1 수용체, EGF 수용체, H-ras, K-ras(p12), L-myc, mdm-1, N-myc, N-ras, p53 엑손 4, p53 엑손 5, p53 엑손 6, p53 엑손 7, p53 엑손 8, p53 엑손 9, TcR- α , TcR- β , TcR- γ , TcR- δ 를 들 수 있다. 환경 독소를 예로 들면 마이크로시스틴, 다이옥신, PCB가 포함된다. 남용 약물로는 암페타민, 바르비투레이트(barbiturate), 벤조디아제핀, 카나비노이드, 코카인, 몰핀, 펜사이클리딘, TBPE 등을 예로 들 수 있다.

<110> 본 발명의 레이저 유발 표면형광 검출 방법 및 장치에서 분석물 시료를 표지하는 형광물질은 흡수파장과 방출파장이 20 nm 이상의 차이가 나는 것을 사용할 수 있는데, 대표적인 형광물질로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 형광 입자, 퀀텀 도트(quantum dot), 란타니드 킬레이트(lanthanide chelate)(예, 사마륨(Sm), 유로피움(Eu) 및 테르븀(Tb)) 및 플루오레센스(fluorescence)(예, FITC, 로다민 그린, 티아디카르보시아닌, Cy2, Cy3, Cy5, Cy5.5, Alexa 488, Alexa 546, Alexa 594 및 Alexa 647)가 포함된다. DNA를 검출하는데 사용되는 바람직한 형광물질은 Cy3와 Cy5이다. 일반적으로 형광의 세기는 여기광의 세기가 지나치게 강하지 않으면 여기 광(excitation light)의 세기에 직접 비례한다.

<111> 본 발명의 레이저 유발 표면형광 검출장치에서 액체 시료 중에 분석물의 존재 유무에 대한 지수로서 작용할 수 있는 표지(label)로는 특징적으로 형광물질이 사용된다. 형광물질은 흡수파장과 방출파장이 20 nm 이상의 차이가 나는 것을 사용할 수 있다. 대표적인 형광물질로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 형광 입자(fluorescence particle), 퀀텀 도트(quantum dot), 란타니드 킬레이트(lanthanide chelate)(예, 사마륨(Sm), 유로퓸(Eu) 및 테르븀(Tb)) 및 플루

오레슨스(fluorescence)(예, FITC, 로다민 그린, 티아다카르보시아닌, Cy2, Cy3, Cy5, Cy5.5, Alexa 488, Alexa 546, Alexa 594 및 Alexa 647)이 포함된다. DNA를 검출하는데 사용되는 바람직한 형광물질은 Cy3과 Cy5이다. 일반적으로 형광의 세기는 여기광(excitation light)의 세기에 직접 비례한다.

<112> 본 발명에 있어서 상기 표지는 링커를 통해 분석물과 특이적으로 결합하는 탐지자와 결합된다. 이러한 링커로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 N-[k-말레이미도운데카노일옥시)]-설포석신아미드 에스테르(설포-KMUS), 석신이미딜-4-[N-말레이미도메틸]-사이클로헥산-1-카르복시[6-아미도카프로레이트](LC-SMCC), N-K-말레이미도우데칸산(KMUA), 석신이미딜-4-[p-말레이미도페닐]부티레이트(SMBP), 석신이미딜-6-[(β-말레이미도-프로피온아미도)헥사노에이트](SMPH), 석신이미딜-4-[N-말레이미도메틸]-사이클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), 설포석신이미딜-4-[N-말레이미도메틸]-사이클로헥산-1-카르복실레이트(설포-SMCC), N-석신이미딜[4-요오도아세틸]아미노벤조에이트(SIAB), 설포석신이미딜[4-요오도아세틸]아미노벤조에이트(설포-SIAB), N-[γ-말레이미도부티릴옥시]설포-석신아미드 에스테르(설포-GMBS), N-[γ-말레이미도부티릴옥시]석신아미드 에스테르(GMBS), 석신이미딜-3-[브로모아세트아미도]프로피오네이트(SBAP), N-β-말레이미도프로피온산(BMPA), N-[α-말레이미도아세톡시]석신아미드 에스테르(AMAS), N-석신이미딜 S-아세틸티오프로피오네이트(SATP), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신아미드 에스테르(MBS), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시설포석신아미드 에스테르(설포-MBS), N-e-말레이미도카프린산(EMCA), N-[e-말레이미도카프로일옥시]석신아미드 에스테르(EMCS), N-석신이미딜-[4-비닐설포닐]벤조에이트(SVSB), N-[β-말레이미도프로필옥시]석신아미드 에스테르(BMPS) 및 1-에틸-3-[3-디메틸아

미노프로필]카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)가 포함된다. 상기 링커들은 예를 들면 탐지자의 티올 그룹과 반응하게 된다.

113> 본 발명에 따른 측방 유동 검정 스트립은 직사각형, 원형, 난형, 삼각형, 기타 여러 모양을 취할 수 있는데 단 시험 용액이 모세관력에 의해 이동할 수 있는 적어도 하나의 방향이 존재하여야 한다. 시험 용액이 가운데서 접촉되는 난형 또는 원형과 같이 다른 이동 방향이 존재할 수 있다. 그러나, 고려되어야 하는 것은 시험 용액이 적어도 하나의 방향으로 예정된 위치로 이동되어야 한다. 본 발명에 따른 스트립의 두께는 중요하지 않지만 보통 0.1 내지 2 mm, 더욱 보통은 0.15 내지 1 mm, 바람직하게는 0.2 내지 0.7 mm이다. 일반적으로, 최소 두께는 스트립 재질의 강도 및 용이한 검출 신호의 생성 필요성에 의해 결정되는 한편 최대 두께는 시약의 취급 용이성 및 시약의 비용에 의해 결정된다. 시약을 보존하고 한정된 크기의 샘플을 제공하기 위해, 스트립의 너비는 일반적으로 비교적 좁게 만들며, 보통은 20 mm 미만, 바람직하게는 10 mm 미만이다. 일반적으로, 스트립의 너비는 약 1.0 mm 미만이어서는 안되며 보통의 범위는 약 2 mm 내지 12 mm이고, 바람직한 범위는 약 4 mm 내지 8 mm이다. 스트립의 길이는 분석물의 종류, 크로마토그래피 매질상의 시험 선 또는 점 및 표준선의 수, 패드사이의 공간, 취급의 편리성 등을 고려하여 결정된다. 보통은 1 내지 40 cm이고, 바람직하게는 약 2 내지 25 cm이며, 더욱 바람직하게는 약 4 내지 20 cm이다. 그러나, 스트립은 실질적으로 어떠한 길이로도 가능할 수 있다.

<114> 분석할 액체 시료를 위한 용매는 보통 수성 매질이며, 이러한 매질은 약 40 중량% 이하의 다른 극성 용매, 특히 알코올, 에테르 등을 포함하여 탄소수 1 내지 6, 더욱 보통은 탄소수가 1 내지 4인 산화 용매를 포함할 수 있다. 보통, 공동용매가 약 20 중량% 미만으로

존재한다. 시료의 성질에 따라 일부 환경하에서 수성 매질중 일부 또는 전부가 시료 자체에 의해 제공될 수 있다.

<115> 매질에 대한 pH는 보통 4 내지 11, 더욱 보통은 5 내지 10, 바람직하게는 6 내지 9이다. pH는 결합 요소들의 중요한 결합 친화성 부위 및 신호 생성 시스템에 의한 신호의 임의 생성을 유지하는 정도로 선택된다. 검정동안에 원하는 pH로 조절하고 그 pH를 유지하기 위해 다양한 완충액을 사용할 수 있다. 대표적인 완충액으로는 보레이트, 포스페이트, 카르보네이트, 트리스, 바르비탈(barbital)이 포함된다. 사용되는 특정 완충액이 중요하지는 않지만 개개의 검정에서 한 완충액이 다른 완충액에 비해 바람직할 수 있다. 바람직하게는 약 0.05 내지 0.5 중량%의 비이온성 세정제(detergent)가 시료에 포함된다. 약 200 내지 20,000 달톤의 여러 폴리옥시알킬렌 화합물이 사용될 수 있다.

<116> 검정을 실시하는 데는 보통 온화한 온도가 사용되며 바람직하게는 실질적으로 일정한 온도가 사용된다. 검정 신호의 생성을 위한 온도는 일반적으로 약 4℃ 내지 50℃, 더욱 보통은 약 10℃ 내지 40℃이고, 흔히하는 주변 온도, 즉 약 15℃ 내지 25℃이다.

<117> 피검 수용액중의 검정될 분석물의 농도는 일반적으로 약 10^{-4} 내지 약 10-15M, 더욱 보통은 약 10^{-6} 내지 10-14M이다. 다른 시약의 농도는 목적하는 분석물의 농도 및 프로토콜과 같은 것을 고려하여 결정하는 것이 보통이다.

<118> 시료 및 시약 용액중에 여러 많은 시약의 농도는 일반적으로 목적하는 분석물의 농도 범위에 의해 결정되는 한편, 각 시약의 최종 농도는 목적하는 범위에서 검정의 감도를 경험에 의해 최적화하는 정도로 결정된다. 특정 프로토콜과 함께 개개의 시약은 검정의 감도를 저하시키지 않는 한 과량으로 사용할 수 있다.

119> 이하, 본 발명에 따른 측방 유동 검정 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치가 일체로 구성된 소형 스캐너에 대해 설명될 것이다.

<120> 측방 유동 검정 스트립의 지지대(backing)

<121> 지지대는 보통 수불용성, 비다공성 및 경직성이고 보통은 이의 위에서 시료를 전개하는 패드의 길이와 너비가 동일하나 보다 크거나 작을 수 있다. 아주 다양한 천연 및 합성의 유기 및 무기 재료를 사용할 수 있는데 다만 지지대는 흡수 물질의 모세 작용을 방해하거나, 분석물과 비특이적으로 결합하거나, 분석물과 탐지자의 반응을 방해해서는 안된다. 대표적인 중합체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 폴리에틸렌, 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 폴리(4-메틸부텐), 폴리스티렌, 폴리메타크릴레이트, 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 나일론, 폴리(비닐 부티레이트), 유리, 세라믹, 금속 등이 포함된다.

<122> 지지대는 그 위로 보통 접착제가 코팅되어 각종 패드가 부착된다. 적절한 접착제의 선택은 스트립의 성능을 개선하고 수명을 연장하는데 도움을 줄 수 있다. 본 발명에 따른 측방 유동 검정 스트립에 사용되는 것으로는 감압성 접착제(pressure-sensitive adhesives, PSA)가 대표적이다. 전형적인 측방 유동 검정 스트립에서 각종 패드의 결합은 접착제가 그들 패드의 기공내로 침투하고 이에 따라 패드가 지지대와 함께 결합함으로써 달성된다. 이와 같이 접착제가 정상적인 조건하에서 이동하는 과정을 콜드 플로우(cold flow)라고 한다. PSA를 패드에 적층하는 과정에서는 가열을 하지 않기 때문에 어느 정도의 콜드 플로우는 패드와 지지대사이의 결합이 형성되기 위해서는 필수적이다. 콜드 플로우의 정도가 너무 낮으면 초기 결합력이

낮아 패드와 지지대의 적절치 못한 결합을 초래할 수 있다. 반대로, 콜드 플로우의 정도가 너무 높으면 특히 스트립의 저장 기간 동안에 함께 결합되어 있는 패드내로 접착제가 이동하여 기공이 차단되거나 소수성 얼룩이 형성되거나 패드의 재습윤 문제가 발생할 수 있다. 이러한 접착제의 콜드 플로우와 연관된 문제는 직접-주조 막을 사용함으로써 해결될 수 있다. 예를 들면, 이러한 막들은 지지 플라스틱 시트에 의해 접착제가 막의 기공으로 들어가는 것을 차단해 주기 때문에 저장동안에 접착제의 상하 이동을 예방할 수 있다.

<123> 측방 유동 검정 스트립의 시료 패드(sample pad)

<124> 시료 패드는 기본적으로 분석물이 함유된 시료를 점수하는 역할을 한다. 이러한 기능에 더하여 시료 패드는 시료중의 불용성 입자를 여과하는 기능을 가질 수 있다. 이러한 관점에서, 본 발명의 시료 패드는 여과 기능을 추가하는 재질인 셀룰로즈 여과지 또는 유리 섬유 여과지가 바람직하다. 일반적으로, S & S사의 셀룰로즈 막(등급 903)이 사용된다.

<125> 시료 패드는 이의 재질에 시료중의 분석물이 비특이적으로 흡착되는 것을 막고, 더불어 시료의 성분들이 크로마토그래피 매질을 통해 용이하게 이동할 수 있도록 보조하며 반응의 감도를 유지하고 라벨-표지된 탐지자와 시료의 성분사이에 이루어질 수 있는 원치 않는 비특이적 반응을 최대한 방지하기 위하여 전처리하는 것이 바람직하다. 시료 패드의 전처리는 보통 불활성 단백질로 샘플 패드를 처리하거나 계면활성제로 처리하여 실시된다. 불활성 단백질로의 전처리는 예를 들면 패드를 0.1 내지 10% 소 혈청 알부민(BSA)-함유 0.1 M 트리스 완충액(pH 6-9), 0.1 M 트리스 완충액(pH 6-9)중의 0.1% 내지 10% 탈지유분의 용액 및/또는 0.1% 내지 10% 카제인 용액에 침지시키고 이 상태로 37℃에서 1시간 또는 4℃에서 24시간 방치한 후 패드를 트리스 완충액으로 세척한 다음 건조시킴으로써 수행된다. 계면활성제로의 전처리는 예를

들면 패드를 비이온성 계면활성제인 트리톤 X-100 또는 트윈 20의 0.01% 내지 1%를 함유한 용액중에 침지시킨 후 건조시킴으로써 수행된다. 바람직한 전처리는 불활성 단백질로 처리하고 또한 계면활성제로 처리하는 것이다. 그러나, 이러한 전처리의 결정은 분석물 및 시료의 종류에 따라 결정될 것이다.

<126> 측방 유동 검정 스트립의 결합체 방출 패드(conjugate releasing pad)

<127> 결합체 방출 패드에는 시료중의 분석물과 반응하여 결합체를 형성할 수 있는 형광물질-표지된 탐지자가 고정되지 않고 흡착되어 있다. 탐지자는 고정되지 않고 흡착되어 있음으로써 시료중의 분석물과의 반응에 의해 결합체를 형성한 후 시료가 크로마토그래피 매질을 통해 전개 이동됨에 따라 함께 이동한다.

<128> 결합체 방출 패드를 위한 재질은 신속한 여과 속도와 함께 양호한 입자 보유를 제공하는 것이 바람직하다. 이러한 것으로는 폴리에스테르와 같은 합성소재 및 유리 섬유 필터가 사용될 수 있다. 일반적으로, S & S사의 유리 섬유 및 폴리에스테르가 사용된다. 이들은 생물학적으로 불활성이고 천연 소재보다 정교한 섬유질을 갖고 있기 때문에 수성 시약이나 시료가 투입되었을 때 뒤틀리거나 팽창하지 않는다. 바람직하게는, 결합체 방출 패드는 이에 분석물과 형광물질-표지된 탐지자가 비특이적으로 흡착되는 것을 방지하면서 결합체의 방출과 이동이 원활이 이루어질 수 있도록 계면활성제와 같은 시약으로 전처리한다.

<129> 결합체 방출 패드에 시약을 흡착시키는 방법은 특정적으로 제형된 고밀도 시약 용액에 유리 섬유와 같은 패드를 담그고 말리는 침지 방법(impregnation process)을 포함한다. 침지 방법은 단순하지만 몇 가지 문제점이 있다. 첫째는 패

드를 말리는 동안에 구겨지거나 비틀릴 수 있다는 것이다. 둘째는 패드를 오븐에서 말리는 동안 패드의 위치에 따라 시약이 표면 장력 및 중력 효과로 인해 이탈되거나 재구성될 수 있다는 점이다. 셋째는 패드 침지욕에서 시간이 경과함에 따라 화학 변화가 일어나 여러 시약간에 상이한 흡착 속도를 초래할 수 있으며 이에 따라 패드상에 시약이 균일하지 않게 코팅된다는 점이다. 이러한 문제점을 최소화하기 위한 한 가지 방법으로는 패드의 건조를 40℃ 미만의 오븐에서 수 시간에 걸쳐서 행하는 것이다. 다른 방법은 오븐에서 건조시키는 대신에 동결건조시키는 것이다. 이러한 동결건조는 탐지자의 안정성을 확보할 수 있다는 점에서 오븐에서 건조하는 것보다 바람직하다.

<130> 침지 방법의 대안으로서, 분주 방법(dispensing process)이 사용된다. 이 방법은 분주기(dispenser)를 사용하여 보통 패드 cm당 12 내지 15 μ l의 시약 용액을 분주한 후 말리는 것이다. 패드를 말리는 것은 침지 방법과 동일하게 실시하며 또한 패드를 동결건조시킬 수 있다.

<131> 다른 관점으로서, 결합체 방출 패드에는 안정화제 및 차단제가 사용될 수 있다. 안정화제의 예로는 수크로즈, 트레할로즈와 같은 당류를 들 수 있다. 차단제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 BSA(소혈청알부민), 젤라틴, 카세인, 탈지유 등과 같은 단백질류가 포함된다.

<132> 측방 유동 점정 스트립의 크로마토그래피 매질

<133> 크로마토그래피 매질은 바람직하게는 액체 시료 및 결합체가 모세관력에 의해 신속하게 이동하여 그 위에 고정된 포획자에 도달될 수 있도록 하는 것이면 어느 것이든 가능할 수 있으며 균일한 특성을 갖는 것이 바람직하다. 일반적으로, 크로마토그래피 매질은 모세관력에 반

응하여 수성 매질에 의해 이동하기 쉽고 기공이 0.1μ 이상, 바람직하게는 1.0μ 이상인 다공성 물질을 가리킨다. 이러한 물질은 일반적으로 친수성이거나 친수성으로 될 수 있으며 예로는 무기 분말(예, 실리카, 황산마그네슘 및 알루미늄); 천연 중합체 물질, 특히 셀룰로즈성 물질 및 셀룰로즈로부터 유도된 물질(예, 필터지, 크로마토그래피지 등과 같은 섬유 함유 지); 합성 또는 변형된 천연 중합체(예, 니트로셀룰로즈, 셀룰로즈 아세테이트, 폴리(비닐 클로라이드), 폴리아크릴아미드, 가교된 덱스트란, 아가로즈, 폴리아크릴레이트 등)이 포함된다. 상기 예시된 물질은 단독으로 사용되거나 다른 물질과 결합시켜 사용할 수 있다. 또 다른 예로는 세라믹 물질을 들 수 있다. 크로마토그래피 매질은 지지대에 결합될 수 있다. 다른 방도로서, 크로마토그래피 매질은 그 자체가 지지체가 될 수 있다. 크로마토그래피 매질은 다작용성이거나 다작용성으로 변형시켜 포획자의 공유 결합을 가능하게 할 수 있다.

<134> 크로마토그래피 매질은, 결합체 패드로부터 이동해 온 분석물과 탐지자의 결합체와 반응하여 포획할 수 있도록 크로마토그래피 매질에 화학적으로 결합 고정되어 있는 포획자가 고농도로 사용되는 경우, 활성화된 필터지를 사용하는 것이 바람직하다. 매질의 재질로서 CNBr 활성화된 셀룰로즈가 선택 사용되는 경우에는 활성화된 셀룰로즈 필터지는 문헌[Ceska and Lundkvist, *Immunochemistry*, 9, 1021 (1972)] 및 [Lehtone, Viljanen et al., *J. Immunol. Methods*, 36, 63 (1980) 및 동일 문헌의 34, 61 (1980)]에 기술된 방법과 같은 공지 방법에 의해 쉽게 제조할 수 있다. 다른 방도로서, 재질이 DBM 활성화된 셀룰로즈가 선택 사용되는 경우에는 문헌[Alwine, *Methods Enzymol.*, 68, 220 (1979)]에 기술된 방법과 같은 공지 방법에 의해 용이하게 제조할 수 있다. 이외에도 시판되고 있는 활성화된 나일론 필름(Pall Immunodyne, USA)을 사용할 수 있다.

135> 크로마토그래피 매질은 포획자를 고정할 수 있는 능력(capacity)이 중요하다. 이러한 결합능(binding capacity)은 매질의 기공 구조 및 매질의 후처리에 따라 달라진다. 본 발명에 있어서 바람직하게 사용될 수 있는 크로마토그래피 매질은 니트로셀룰로즈(NC) 막이며 이의 예는 하기 표 1에 기술되어 있다.

136> 【표 1】

제조사	제품명	Sec/4cm (유속(a))	IgG/cm ² (b)
S & S (지지대가 결합되지 않은 것)	AE 98	160-210	20-30ug
	AE 99	120-160	20-30ug
	AE 100	90-120	20-30ug
Millipore (지지대가 결합된 것)	HF 090	80-100)95
	HF 120	107-133)95
	HF 135	120-150)95
	HF 180	160-200)95
	HF 240	214-266)120
	CN 90	88-94	10-30
Sartorius (지지대가 결합된 것)	CN 140	137-153	10-30
	CN 200	205-233	10-30

<137> (a) 증류수가 매질을 타고 4cm 오르는데 걸리는 시간

<138> (b) 결합능 - 매질제공 센티 당 붙을 수 있는 IgG의 양.

<139> 바람직한 크로마토그래피 매질은 CN 90 막이다. CN 90 막은 위의 제품군들 중 유속 변화 폭이 +/- 3 초로서 가장 좁은 범위의 변화 폭을 가지고 있다. 결합능은 형광 표지물질의 증폭이 워낙 뛰어난 탓에 10 내지 30ug 정도로도 충분한 것이다. 무엇보다도 이 막의 가장 큰 장점은 측방 유동 속도의 재현성이 뛰어나다는 점이다.

140> 포획자는 크로마토그래피 매질상에 화학적으로 결합하여 고정된다. 이러한 화학적 결합은 공지 방법(LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Volume 15, Edited by R. H. BURDON and P. H. Van KNIPPENBERG ELSEVIER AMSTERDAM: NEW YORK, OXFORD (1985) P. 318-322)에 따라 실시될 수 있다. 또한, 포획자는 크로마토그래피 매질상에 제2 물질(예, 항체 단백질)을 통해 결합될 수 있다. 제2 물질이 항체(제2 항체)이고 고정될 포획자가 마우스로부터 유래된 모노클로날 항체인 경우 과량의 항-마우스 γ G(감마 글로불린) 헤테로-동물 항체가 결합된 후 적절한 양의 포획자(모노클로날 항체)가 면역반응에 의해 결합되는 활성화된 페이퍼 시트가 사용될 수 있다. 만일 제2 물질이 단백질인 경우에는 예를 들면 과량의 단백질 A가 결합된 후 적당량의 포획항체가 결합되는 활성화된 페이퍼 시트가 사용될 수 있다.

<141> 크로마토그래피 매질상의 검사창에서 시험선을 균일하게 습윤시키기 위한 방법으로 차단(blocking) 기술을 사용하는 것이다. 크로마토그래피 매질의 재습윤을 강화하는 물질로 크로마토그래피 매질을 차단시키는 것은 신속하고 균일한 매질의 재습윤을 보장한다. 차단제로 사용되는 것은 네 종류로 나누어 볼 수 있다: 단백질(예, BSA 및 젤라틴), 계면활성제(SDS, 트윈 20 및 트리톤 X-100), 중합체(PVA, PEG 및 PVP). 차단제는 세 가지 지점에서 사용될 수 있다. 첫째는 차단제를 크로마토그래피 매질에 적용하는 것이다. 이 방식은 아주 균일한 재습윤 효과를 제공할 수 있는 반면 매질은 포획자의 적용 후 그러나 시료 패드의 부착 이전에 차단되어야 하고 고가의 코팅 장비를 필요로 하며 포획자를 채용해시킬 필요가 있고 차단제 자체는 포획자의 항원성 및 저장 수명을 감소시킬 수 있다. 둘째는 차단제를 시료 패드 또는 결합체 방출 패드에 혼입시키는 것이다. 이 방식은 비용이 적게 들고 실시가 용이하다는 점과 포획자를 채용해시킬 필요가 없다는 점이 있으나 차단 효과가 떨어진다는 단점이 있다. 이 방법은 비록 첫

번째 방식에 비해 차단 효율이 떨어지기는 하나 취급의 용이성 측면에서 바람직한 방법이다. 셋째는 포획자 적용 완충액에 차단제를 함유시키는 것이다. 이 방식 또한 비용이 적게 들고 실시가 용이하다는 점이 있으나 차단 효과가 좋지 않고 차단제의 함유로 인해 포획자의 항원성 및/또는 저장 수명이 저하되고 포획자가 번질 가능성이 높다.

<142> 시료 패드, 결합체 방출 패드 및 크로마토그래피 매질에서 사용되는 시약의 비특이적 결합을 방지하기 위해 두 가지 방법이 사용될 수 있다. 한 가지 방법은 포획자가 적용된 후 크로마토그래피 매질을 단백질 또는 고도의 극성 중합체(예, 폴리비닐 알코올)가 함유된 용액에 침지시키거나 이러한 용액으로 분무시켜 크로마토그래피 매질상의 비특이적 결합 부위를 차단하는 것이다. 그러나, 이 기술은 특히 포획자가 차단 단계 이전에 완전한 건조에 의해 최적으로 고정되지 않은 경우 포획자를 치환시킬 수 있는 가능성이 있다. 다른 방법은 시료 패드에 차단제를 첨가하는 것이다. 차단제는 적어도 초기에는 포획자가 크로마토그래피 매질에 결합하는 것을 방해하지 않을 수 있다. 액체 시료가 시료 패드에 적하될 때 차단제는 시료 패드에서 재용해되고 시료와 함께 이동한다. 이상적으로는, 시료에 존재하는 분석물과 탐지자 모두의 비특이적 결합을 방지하기 위해 충분한 양의 차단제를 시료 패드에 첨가하는 것이다.

<143> 본 발명은 추가의 바람직한 양태로서 바이오틴-아비딘 결합체를 이용한다. 즉, 포획자(예, 항체 또는 항원 단백질)를 스트립상의 시험선에 분주하지 않고 아비딘을 분주하여 고정화한다. 대신 포획자에 바이오틴을 부착하여 바이오틴이 아비딘과 결합하면서 포획자가 스트립상의 시험선에서 자동적으로 탐지될 수 있다. 포획자에 바이오틴을 결합시킬 때에는 포획자가 단백질인 경우에 아미노산 중 리신 또는 아르기닌의 아민기를 이용함으로써 단백질의 특정 부위에 특이적으로 바이오틴이 결합하게 된다. 바이오틴이 결합된 단백질은 스트립상에 분주되어 고정화된 아비딘과 특이적으로 결합하게 되고 항상 같은 방향의 방향성을 유지하게 되며,

흡착에 의한 결합이 아니므로 포획자로 사용되는 단백질의 구조나 기능에 변화가 적다. 이러한 이유로 인하여 기존의 비특이적으로 방향성 없이 스트립의 막상에 고정화되던 방법과는 다르게 바이오틴-아비딘 방법은 포획 단백질이 항상 일정한 방향으로 고정화가 되어 동일한 방향성을 갖게 되고, 그 구조나 기능에 변화가 없음으로서 보다 더 효과적으로 검체내에 존재하는 분석물과 반응을 할 수가 있다. 따라서 바이오틴-아비딘 방법은 동일한 분석물의 농도에서 더욱 높은 감도를 유지 할 수가 있다. 기존에 사용하던 고정화 물질의 농도보다 최저 10-100배의 낮은 농도를 사용하더라도 높은 감도를 유지 할 수가 있다. 그리고 아비딘이 분주된 스트립을 사용하면 비록 분석물이 상이한 경우에도 새로운 타입의 스트립을 준비하지 않아도 된다는 장점이 있다. 즉 아비딘 스트립을 공통적으로 사용할 수 있다. 다만 각기 다른 단백질-바이오틴 결합체와 탐지자인 단백질-형광 결합체만을 준비함으로써 다양한 측정 항목을 실험 할 수가 있다. 본 방법은 기존 방법과 동일하게 결합체 패드를 사용하여 제조 할 수도 있으며 또한 결합체 패드를 제조하지 않고 용액 상태로 분석물과 반응하여 결합체 패드 없이 직접 샘플패드에 분석물과 단백질-바이오틴 결합체와 단백질-형광 결합체를 혼합하여 첨가함으로써 실험을 수행할 수도 있다. 도 17은 스트립상의 시험선에 바이오틴-아비딘 시스템을 이용한 것과 기존 방법을 이용한 비교 모식도입니다.

<144> 측방 유동 검정 스트립의 흡수 패드(absorption pad)

<145> 흡수 패드는 모세관 작용에 의한 크로마토그래피에 의해 이동해 온 시료를 물리적으로 흡수하고 또한 미반응 물질을 제거하기 위한 수단이다. 즉, 흡수 패드는 측방 유동 검정 스트립의 말단에 설정되어 크로마토그래피 매질을 따라 이동해 오는 시료 및 시약의 속도를 조절 및 촉진하고 이를 담아두는 펌프 또는 저장소로서 작용한다. 시료 및 시약의 이동 속도는 흡

수 패드의 질 및 크기에 따라 다를 수 있으며 보통 사용되는 흡수 패드는 셀룰로즈 여과지, 부직물, 천 또는 셀룰로즈 아세테이트와 같은 수-흡수 재질로부터 형성된 것들이다.

146> 본 발명에 따른 측방 유동 검정 스트립은 본원에 첨부된 도면을 참고로 하여 좀더 구체적으로 예시될 것이다. 이러한 예시로부터 본 발명의 특징 및 장점은 명백할 것이다.

147> 도 1 및 도 2은 종래의 측방 유동 검정 스트립을 보여준다. 도 1로부터 종래 측방 유동 검정 스트립(20)은 지지대(21)상의 접촉층을 매개로 하여 지지대의 한쪽 말단에 분석물을 함유한 액체 시료가 투입되는 시료 패드(24)가 부착되어 있고 이어서 지지대(21)의 반대쪽 말단 방향으로 결합체 방출 패드(25), 크로마토그래피 매질(23) 및 흡수 패드(26)가 부착되어 있다. 결합체 방출 패드(25)상에는 액체 시료가 모세관 현상에 의해 크로마토그래피적으로 이동하면서 액체 시료중의 분석물과 반응하여 결합체를 형성할 수 있는 표지된 탐지자가 비고정적으로 흡착되어 있다. 크로마토그래피 매질(23)상에는 탐지자와 동일하거나 상이한 포획자가 한 선(시험선)(29)으로 화학적 결합에 의해 매질(4)상에 고정되도록 분주되어 있으며, 이러한 한 선의 포획자(29)는 액체 시료 및 상기 결합체 방출 패드(25)에서 형성된 결합체가 크로마토그래피적으로 이동해 오면서 화학적으로 반응하여 그 결합체를 포획하여 표지된 탐지자-분석물-포획자의 복합체를 형성한다. 나머지 미반응된 물질 및 액체 시료는 계속해서 크로마토그래피적으로 이동하면서 지지대의 말단에 부착되어 있는 흡수 패드(26)로 흡수된다. 분석물의 양은 복합체의 양으로서 결정되며, 이러한 복합체의 양은 크로마토그래피 매질상에 포획 고정된 복합체의 발광 세기를, 사전에 탐지자와 동일하게 표지되고 탐지자 및 포획자와 상이한 표준 탐지

자와 이 표준 탐지자와 상이하고 비표지된 표준 포획자가 반응하여 형성된 복합체에 대해 표준 발광 세기를 정량화하고 이를 상대적인 값으로 산정함으로써 분석물을 정량한다.

148> 상기된 바와 같이 종래의 측방 유동 검정 스트립은 생물 시료중의 분석물에 대해 단지 한 종류만을 정량 분석하기 위한 의도로 고안되어 있다.

149> 도 1 내지 도 9는 본 발명의 한 양태로서 측방 유동 검정 스트립을 보여준다. 이 측방 유동 검정 스트립은 결합체 방출 패드(25)상에 3 내지 5 종류의 탐지자를 비고정적으로 흡착시키고 AFP, CEA, CA15-3, CA19-9, CA125 중에서 탐지자의 종류와 동일한 수의 포획자가 선택되어 동일한 수의 선으로 검사창에 분주 고정되어 3 내지 5 종류의 분석물을 동시에 정량 검정할 수 있는 방식이다.

<150> 본 발명은, 표면형광의 세기를 측정하여 분석물을 정량하기 위하여, 레이저, 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈, 여기필터, 포집렌즈, 형광필터, 집광렌즈, 공간필터, 광검출기, 아날로그 디지털 컨버터(ADC) 및 CPU로 구성되고, 이들 구성 요소들은 액체 시료가 상기 스트립의 크로마토그래피 매질을 따라 이동하면서 상기 검사창에서 형성된 형광물질 표지된 탐지자-분석물-포획자의 복합체 및 상기 표준선에서 형성된 형광물질 표지된 표준 탐지자-표준물-표준 포획자의 표준 복합체의 표면형광 매질이 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈로부터 입사하고 여기필터에 통과한 빛을 조사하여 이로부터 반사된 빛을 포집렌즈에 통과시켜 평행광을 형성하고, 이 평행광을 형광필터에 통과시켜 산란광을 걸러내고 순수한 형광성분만 집광

렌즈로 입사시키고, 이 집광렌즈에 의해 순수한 형광 성분이 공간필터의 중심으로 집속되며, 상기 공간필터에서 평행광선 이외의 빛을 제거하고, 이 평행광선이 광검출기로 입사되며, 광검출기로 입사된 평행광선이 아날로그 디지털 컨버터(ADC)를 통해 CPU로 전달되도록 배치되어 있는 레이저 유발 표면형광 검출 장치를 사용한다.

<151> 본 발명의 레이저 유발 표면형광 검출 장치에 사용되는 레이저는 대표적으로 He-Ne 레이저 및 다이오드 레이저가 포함된다. He-Ne 레이저의 예로는 National Research Laboratory of Metrology(NRLM), agency of Industrial Science and Technology(AIST), ministry of International Trade and Industry(MITI)에서 개발한 소형의 휴대용 정밀 유도도-안정화 He-Ne 레이저(Model NEO-92SI) 및 모델 05 LYR 173(캘리포니아 어어빈 소재 Melles Griot 제품)을 들 수 있다. 다이오드 레이저는 He-Ne 레이저보다 컴팩트하고 보다 정밀하며 청색-근적외선 영역을 포함하는 다이오드 레이저가 있어 원하는 파장대를 골라 선택할 수 있다.

<152> 본 발명에서 사용되는 레이저 유발 표면형광 검출 장치는 상기한 바와 같이 레이저, 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈, 여기필터, 포집렌즈, 형광필터, 집광렌즈, 공간필터, 광검출기, 아날로그 디지털 컨버터(ADC) 및 CPU로 구성되며 이러한 구성에 의한 표면형광의 포집 원리는 도 11 및 도 12를 참고로 하여 이하에서 구체적으로 설명될 것이다.

<153> 도 11 및 12에서 보는 바와 같이, 본 발명의 레이저 유발 표면형광 검출 장치의 동작은 레이저 광원(11)의 빛을 레이저의 레이저 빔 형상 제어용 렌즈(미도

시)를 통하여 점광원 또는 선형 모양으로 가공한 뒤 이를 입사필터(41)를 통과하게 한 뒤 시료(20)의 지정된 위치에 입사하도록 한다. 이 위치에서 시료의 타겟(target) 물질에 부착된 염료가 레이저 에너지를 흡수하여 형광을 발광하면, 포집렌즈(46)에 통과시켜 평행광을 형성하고, 이 평행광을 형광필터(45)에 통과시켜 산란광을 걸러내고 순수한 형광 성분만 집광렌즈(44)로 입사시키고, 이 집광렌즈(44)에 의해 순수한 형광 성분이 공간필터(43)의 중심으로 집속되며, 상기 공간필터(43)에서 평행광선 이외의 빛을 제거하고, 이 평행광선이 광검출기(42)에 이른다. 이 광 검출기는 아날로그 디지털 컨버터(ADC)에 연결되어 있어 이 ADC에 의해 변환된 디지털 신호, 즉 전기 신호가 중앙 처리 장치(CPU)(33)로 전달되어 CPU에 내장된 소프트웨어에 의하여 전달된 전기신호가 처리되어 원하는 정보로 환산된 후 표시부(40) 및 프린터(40') 또는 외부 연결망으로 전송되어 출력된다. 측정이 진행되는 동안 시료(20)는 이송장치(34)에 의하여 시료에 맞도록 지정된 방식으로 이동함으로써 시료 전반에 걸친 형광, 즉 시료의 분포에 대한 정보를 얻을 수 있다.

<154> 도 11은 본 발명의 가장 핵심부인 형광 및 산란광을 집속하여 형광만을 선별하여 유효 신호를 생산하는 부위의 개략도이다. 광원인 반도체 레이저(11)에서 출사한 광은 레이저 전방부에 위치한 레이저빔 형상제어용 렌즈에 의하여 에어리 직경 100 마이크로미터 정도의 원반형 점 또는 길이가 2mm 정도 되며 폭이 100 마이크로미터에 인접한 좁고 긴 타원모양으로 변환되어 시료(20) 표면에 입사한다. 반도체 레이저는 특히 온도와 전류에 의하여 그 방출파장이 변하는 특성이 있기 때문에 이 입사광의 파장이 형광의 파장에 지나치게 근접하는 것을 사전에 방지하는 목적으로 입사필터(excitation filter)(41)를 사용한다. 이 필터(41)는 다층박막을 이용한 간섭식 저역 투과필터이며, 이상적으로는 컷오프 파장에서 단계형(step) 차단/투과 특성을 발휘하여야 한다.

155> 그리고, 표면 형광 검출 장치에 적용되어 사용될 수 있는 본 발명의 시료 제어수단으로서 시료를 전후좌우 및 상하로 이송할 수 있는 이송장치(34)는 그 구성 및 구조가 이미 잘 공지되어 있으므로, 이에 대한 구체적인 설명은 생략한다.

156> 도 12는 본 발명의 소형스캐너의 표면형광 검출에 대한 전체적인 흐름도이다. 이 계통의 중심에는 탑재된 중앙 처리 장치(33)가 있으며, 이 중앙 처리 장치(33)는 사용자가 직접 명령을 내릴 수 있는 키들과, 위치 센서와, 시료를 이송하기 위한 이송장치와, 메모리와, 외장 탈착식 건전지 전원을 사용하고 사용 가능한 시간 또는 측정 가능 회수를 예고할 수 있는 전원 감시부, 및 표시부와 프린터 등의 출력부 등의 주변 보조 장치들과 연결되어 이들을 제어하면서 이들을 통하여 광원의 단속, 스트립의 이동, 검출 신호의 처리 그리고 결과의 표시 및 출력 등의 제반 과정을 통괄하는 기능을 담당한다. 이러한 기능은 이 중앙 처리 장치(33)에 입력하는 소프트웨어를 통하여 개정 혹은 개선을 할 수 있다. 이 소프트웨어는 광 검출기의 신호 외에도 사용자가 지정하는 입력사항, 카트리지의 종류, 광원의 세기, 시료 카트리지의 시작 및 현재 위치 등의 관련 정보를 통합하여 중앙처리장치에서 적절한 처리가 이루어지도록 되어있다. 아울러 이 장치는 내장 기억용량을 이용하여 일정한 회수의 측정 결과를 임시로 저장할 수 있으며, 외부 통신장비와의 프로토콜(protocol)을 이용하여 그 저장된 자료를 요구하는 쪽으로 전송할 수 있는 기능을 설정할 수 있다.

<157> 도 13은 본 발명의 스트립과 카트리지의 하우징 윈도우 벽면의 경사 상태를 도시하는 단면도이고, 도 14는 본 발명의 카트리지의 단면도이다.

<158> 도 13 및 도 14를 참조하면, 도 13에 도시된 스트립은 도 14의 카트리지 안에 장착되며 표면 형광 검출시 카트리지 하우징 윈도우의 벽면에 의해서 입사한 레이저의 빛은 스트립의 형광을 발광시킨 후 난반사 하게 되며 이때 빛의 산란광은 스트립의 깊이와 스트립과 카트리지의

하우징 윈도우 벽면의 경사 각도(α)에 따라 스트립의 시료 표면에 위치한 먼지 등에 의해 난반사되어 노이즈(noise)처럼 작용하게 되는데 이와 같이 노이즈가 발생하고 또 그 정도가 큰 경우 검출 과정에서 대부분의 빛을 소모하기 때문에 광원이 아주 밝아야 하거나 스트립의 시료 자체가 상당히 많은 형광을 발해야만 하는 단점을 지닌다. 이에 따라 스트립 표면에 위치한 먼지 등에 의한 노이즈를 제거하기 위한 별도의 공간 필터가 필요하게 되며 노이즈의 발생 정도는 스트립의 깊이와 스트립과 카트리지의 하우징 윈도우 벽면의 경사 각도(α)에 따라 달라진다. 따라서, 스트립과 카트리지의 하우징 윈도우 벽면의 경사 각도(α)를 적절히 조절하여 노이즈를 줄여야 할 필요성이 발생하며 아래 표에서 보는 바와 같이 스트립과 카트리지의 하우징 윈도우 벽면의 경사 각도(α)를 20° 이하로 하는 것이 노이즈 발생율을 가장 낮게 하여 빛의 효율을 증가시킬 수 있다.

<159>

Strip angle	Noise increase
1-10	10%
20	10%
30	25%
40	30%

<160> 도 15는 pH 페이퍼나 단백질에 부착된 지시자를 이용하여 샘플이 투입된 후 일정 시간이 지난 다음 판독하여 분석물 농도를 측정하는 상태를 도시하는 도면이고, 도 16은 스트립 위에 시간 관리선으로서 항탐지자 리간드를 분주하여 탐지자가 쌓여 형광을 발할 때 판독하여 분석물 농도를 측정하는 상태를 도시하는 도면이다.

<161> 도 15 및 도 16에서 보는 바와 같이, 측방 유동 정량 검정의 원리로 분석물을 측정하는 많은 키트의 경우 샘플 투입 후 경과 시간을 타이머(timer)로 잰 다음 판독을 하게끔 되어 있어 경과 시간을 정확히 측정해야 하고 외부온도나 습도 등에 의한 용액의 이동시간의 편차 등이 측정의 정확성을 떨어뜨리는 요인으로 작용하게 된다. 스트립 안에 샘플이 투입된 지 얼마

나. 시간이 경과 하였는지 또는 멤브레인상에 용액의 이동상황을 알 수 있는 장치를 설계함으로써 기기가 자동적으로 판독하기 시작하게끔 한다. 이와 같은 목적을 달성하기 위하여 크게 두 가지 원리를 사용한 장치를 설계할 수 있다.

162> 첫째, pH변화에 따른 지시자(indicator)의 색변화를 구별하는 장치.

163> 둘째, 멤브레인에 시간의 경과에 따라 증가하는 형광값을 측정하여 일정시간에 판독(reading)을 시작하는 장치.

<164> 첫 번째 장치의 경우에 있어서는 pH paper나 단백질에 부착된 지시자를 사용한다. Paper나 지시자의 기본 색깔은 노란색으로써 약염기성인 sample이 흡수 패드에 도달하여 paper/지시자를 적시고 그에 따라 색깔이 붉은색으로 변하고 시간의 경과에 따라 용액의 흐름이 더욱 많아져 지시약이 씻기므로 흰색을 띄게 되는 원리를 이용한다.

<165> 판독(Reading) 20초 마다

<166> 실시예) 노란색 -----> No -----> Wait -----> 색깔 판정 다시

<167> 붉은색 -----> 'Yes

<168> 흰색 -----> No -----> error (시간 경과)

<169> 두 번째 장치의 경우에 있어서는 멤브레인 위에 시간관리선(time control line)으로써 항탐지자 리간드(anti-detector ligand)를 분주하여 탐지자가 쌓여 일정 수준 이상의 형광의 세기가 나타나면 전체 스트립의 판독을 시작하는 원리이다. 수준 이상의 형광의 세기에서는 시험선(Test line)과 관리선(control line)의 형광값의 비가 안정화 되고 이 시점을 판독 개시점

으로 정하는 것이다. 기기의 레이저는 시간 판독 윈도우를 20초마다 스캐닝하여 형광의 세기를 측정하여 전체 스트립을 판독할 것인지 더 기다릴 것인지에 대한 결정을 하게 된다.

170> 실험예) 시간 변화에 따른 CRP 형광 세기 peak의 변화 측정

171> 시간 (분)	Time control line의 형광의 세기	Control과 Testline의 형광값의 비	비고
1	~100	~0.2	
5	~250	~0.6	
10	~400	~1.0	
12	~500		← Reading point.
14	~600		

<172> 한편, 일반적으로 측정하고자 하는 물질의 혈액 중(마이크로시스틴은 환경물질이므로 혈액이 아니라 수질 내에 존재함) 컷오프는 다음의 표 2에 수록된 바와 같다.

<173> 【표 2】

마커	단위	컷오프
CEA	ng/ml	<5
AFP	ng/ml	<15
PSA	ng/ml	<4
B2M	ng/ml	<2
NSE	ng/ml	<15
CYFRA21-1	ng/ml	<3.5
마이오글로빈	ng/ml	<70
CK-MB	ng/ml	<3
cTnI	ng/ml	<1
cTnT	pg/ml	<60
BNP	pg/ml	<100
마이크로시스틴	pg/ml	<300

174> 본 발명에 따른 추가의 양태로서 pg/ml까지 측정가능한 분석물로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하기 표 3에 수록된 바와 같다.

175> 【표 3】

분석물	단위	컷오프
ACTH	pg/ml	200-250
아드레노메들린	pg/ml	480 \pm 35pg/ml
ANP	pg/ml	73pg/ml
안지오텐신 II	pg/ml	21 \pm 4pg/ml
칼시토닌	pg/ml	10pg/ml
CNP	pg/ml	7.36 \pm 8.0pg/ml
엔돌핀	pg/ml	30 \pm 5pg/ml
가스트린	pg/ml	26.4 \pm 8.4pg/ml
그렐린	pg/ml	87.79 \pm 10.27pg/ml
NPY	pg/ml	70.7 \pm 5.9pg/ml
췌장 폴리펩타이드	pg/ml	218 \pm 3pg/ml
우로텐신 II	pg/ml	7.70 \pm 0.97pg/ml

<176> 본 발명에 따른 레이저 유발 표면형광 검출 장치는 분석물의 최저 검출 한계 농도가 pg/ml까지 측정되는 것으로 밝혀졌다.

<177> 본 발명은 이하 실시예를 통해 좀더 구체적으로 설명될 것이다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 단지 예시하는 것으로 이해되어야 하며 본 발명을 이들 실시예로 한정되어서는 안 된다.

178> 실시예 1

179> 탐지자 및 포획자로 사용하기 위한 모노클로날 항체의 제조 방법

180> (1) 배양액의 준비

181> 돌베코 변형 이글 배지(Dulecco's modified Eagle's media, DMEM) 분말을 900ml의 DDW에 녹이고 형성된 용액에 3.7g의 중탄산나트륨(sodium bicarbonate)을 가한 다음 pH를 6.9로 조정하였다. 이 배양액을 0.45 μ m 크기의 필터를 사용하여 무균화시키고 이 용액을 불완전 (incomplete) DMEM이라 하며 450ml의 불완전 DMEM에 10%가 되도록 송아지 혈청(Bovine Calf Serum)과 항생제 페니실린과 스트렙토마이신(penicillin - streptomycin)을 첨가하여 완전 (complete) DMEM으로 만들었다. 이 완전 DMEM에 5ml의 100X HT를 첨가하여 HT(하이포크산틴+티미딘) 배양액, 5ml의 100X HAT(하이포크산틴+아미노프테린+티미딘)을 첨가하여 HAT 배양액을 준비하였다.

182> (2) 항원 준비와 주사

183> 처음 주사할 경우 정제된 효소 단백질 용액(50 μ g)에 같은 부피(주로 0.3ml)의 완전 프로인드 보조제(Complete Freund's Adjuvant)를 넣고 30초 동안 음파처리(sonication)한 후 이 용액을 BALB/c 생쥐에 각각 0.4ml씩 주사하였다. 첫 번째 주사 후 3주 경과하여 단백질 용액을 불완전 프로인드 보조제(Incomplete Freund's Adjuvant)와 섞은 후 주사하는 데 이 추가접종 (booster injection)을 2 또는 3차례 반복하고 최종 면역시에는 세포 융합 실험 3 내지 4일 전

에 보조제 없이 단백질만 주사하였다. 실험에 사용되는 생쥐는 암수 구별 없이 모두 생후 6 내지 8주 정도 되는 BALB/c를 사용한다.

184> (3) 지지세포(Feeder Cell)의 준비

185> 지지세포는 융합 실험하기 하루나 이틀 전에 준비하는 데 생후 10주 이상 된 생쥐를 치사시킨 후 복부 껍질을 아주 조심스럽게 벗기고 5ml의 11.6% 설탕용액을 복강 속으로 주사하였다. 1 내지 2분 후 주사기를 사용하여 복강 내의 주사된 설탕용액 3ml 이상을 회수하여 원심분리(2,000rpm, 3분)한 후 지지세포를 30ml의 HAT 배양액에 녹인 다음 5개의 96웰 평판에 한 방울씩 분주하였다. 만약 생쥐가 작으면 두 마리로부터 복강 세포를 채취하였고, 만약 적혈구가 들어있을 경우 다시 준비하였다.

<186> (4) 지라세포의 준비

<187> 항원을 면역시킨 쥐를 치사시킨 후 지라를 무균 상태에서 취한 다음 10ml의 불완전 DMEM이 들어있는 배양접시에 옮긴 후 가는 핀셋을 사용하여 조직을 파쇄하고 지라 세포를 배양액내로 방출시켰다. 이 세포들을 15ml 튜브로 옮겨 큰 조직이나 파쇄되지 않은 세포들을 2분 동안 가라앉힌 후 윗부분에서 5ml을 다시 채취하였다. 이를 원심 분리하여 모은 다음 상등액을 제거하고 준비된 골수종 세포(myeloma)와 합치기 위해 3ml의 불완전 DMEM에 녹여 놓았다. 한번 세포융합 실험을 하기 위해 3×10^7 개의 지라세포를 준비하였다.

<188> (5) 골수종 세포의 준비

<189> 세포융합 실험 5일전 질소탱크에 얼려져 있던 SP2/O Ag14 세포를 꺼내어 녹인 후 완전 DMEM을 매우 천천히 첨가하여 회복시켰다. 이를 원심분리하여 가라앉은 세포를 다시 10ml의 완

전 DMEM에 녹여 37℃ CO2 배양기에서 이를 간격으로 계대 배양하였다. 세포융합 실험 때까지 5×10⁷개의 골수종 세포를 준비하여 이를 사용하였다.

190> (6) 세포융합

191> 준비된 지라세포와 골수종 세포를 섞고 원심분리(2,000rpm, 3분)하여 얻은 세포에 20ml의 불완전 DMEM을 첨가하여 한번 씻고 상등액을 완전히 제거하였다. 이후의 세포융합 반응은 손으로 감싸 37℃를 유지해주면서 실시하는데 밀부분에 가라앉은 세포들은 손가락으로 튜브를 치면서 완전히 부수고 1ml의 50% PEG용액을 한 방울씩 천천히 1분동안 가하고 90초 동안 흔들어 세포융합 과정을 실시하였다. 정확하게 첫 PEG(폴리에틸렌글리콜)용액 방울을 넣기 시작한 후 2분30초 후에 불완전 DMEM을 첨가하면서 정지시키는데 PEG용액에 의해 세포막이 입을 수 있는 삼투압 충격을 막기 위해서 처음 1ml의 불완전 DMEM은 1분 동안에, 다음 2ml을 1분 그리고 다음 3ml을 1분 등의 방법으로 전체 20ml의 불완전 DMEM을 서서히 튜브에 첨가하였다. 이런 방식으로 융합된 세포들을 원심분리시키고 20ml의 HAT 배양액을 가해 남아있는 PEG를 씻어준 후 얻은 세포들을 65ml의 HAT배양액에 녹여 한 방울씩 지지세포가 들어있는 96웰 평판에 두 방울씩 분주하여 37℃, CO2 배양기에서 배양하였다. 세포융합 후 3일째에 세 방울의 HT 배양액을 각 웰에 새로 첨가하고 다시 3일 간격으로 새로운 HT 배양액으로 갈아주면서 세포의 성장을 현미경으로 확인하였다. 대개 융합 4일 후면 하이브리도마 콜로니가 보이기 시작하고 7일경부터 하이브리도마 스크리닝을 시작하였다. 배양 상등액 200 μ l를 400 μ l의 PBS가 담긴 24웰 평판으로 옮긴 다음 ELISA 방법에서 양성 반응을 보이는 웰의 세포를 1ml의 HT 배양액이 들어있는 새로운 24웰 평판으로 옮겨 3 내지 4일 더 배양하였다. 이 배양액 500 μ l를 2ml의 PBS가 들어 있는 15ml 튜브에 넣어 웨스턴 블롯 분석(western blot)을 통해 다시 양성 반응을 보이는 세포

를 5ml의 HT배양액이 담긴 6웰 평판으로 옮겨 성장시킨 후 신속하게 얼리고 하이브리도마 세포주를 클로닝하는 방법으로 제한 희석(limiting dilution)을 실시하였다.

192> (7) 하이브리도마 세포의 동결 방법

193> 10ml의 배양 플라스크에서 단층으로(confluent) 자란 세포를 원심분리하여 얻은 후 가라앉은 세포들을 1ml의 동결 배지(Freezing Media)(90% 송아지 혈청, 10% DMSO)에 녹인 후 동결 바이알에 넣고 스티로폼(styrofoam) 상자에 담아 -70℃에서 서서히 온도가 떨어지게 하였다. 2시간이 지난 후 빠르게 액체질소 탱크로 옮겨 보관하는데 이곳에서 거의 영구적으로 보관할 수 있다.

<194> (8) 하이브리도마 세포의 제한 희석

<195> 하나의 에피토프에 반응하는 항체를 만들어 내는 세포를 골라내기 위해 제한 희석 방법을 수행하였다. 먼저, 로그 단계(log phase)에서 자라고 있는 하이브리도마 세포의 숫자를 너이바우어 세포 계수기(Neubauer Cell Counter)로 계산한 다음 연속 희석으로 1ml당 15개 세포가 포함될 수 있게, 즉 한 방울에 하나의 세포가 들어가게 한 다음 하루나 이틀 전에 준비된 지지세포가 담긴 96웰 평판에 한 방울씩 옮겼다. 3일 마다 배양액을 계속 갈아주고 5일째 역상 현미경(inverted microscope)으로 관찰하여 단일 콜로니가 보이는 웰을 표시하였다. 이후, 14일째 24웰로 옮겨 계속 배양한 다음 ELISA를 통해 탐색한 후 원하는 항체를 만들어내는 하이브리도마 세포를 취해 얼려 보관하였다.

<196> (9) 복수액(Ascites fluid)의 생성

<197> 다량의 단일 클론항체가 필요할 경우 500 μ l의 프리스탄(pristane)을 미리 주사한 BALB/c 생쥐에 9일이 경과한 후 원하는 항체를 만들어내는 하이브리도마 세포를 1~107개정도 주사하

였다. 이후 10 내지 15일 후 적당하게 복부가 비대해진 생쥐를 마취시키거나 치사시킨 후 주사기를 사용하여 복수를 채취하고 원심분리(4℃, 15,000rpm, 10분)하여 세포와 조직을 제거하고 이 상등액을 나누어 -70℃에서 얼려 보관하고 이후 프로테인 A 컬럼(Protein A column)을 이용하여 복수에 포함되어 있는 IgG를 분리하였다.

<198> (10) 각 분석물에 대한 모노클로날 항체의 비교

	PSA	Free PSA	AFP	CEA
<199> 항원원	정액(a)	정액(a)	양수(b)	사람 체액(c)
포획항체	32c5(IgG2a)	83c1(IgG1)	15c3(IgG2a)	34(IgG1)
탐지항체	1c1(IgG2a)	1c1(IgG2a)	20c4(IgG1)	17(IgG2a)
피복완충액	인산염 완충액 (0.1M, pH 7.4)	트리스 완충액 (0.15M, pH 8.0)	보락스(Borax) 완 충액 (0.2M, pH 8.3)	탄산염 완충액 (0.5M, pH 9.5)
표지완충액	PBS	PBS	PBS	PBS

<200> (a) Scripps로부터 입수

<201> (b) RDI로부터 입수

<202> (c) Biodesign으로부터 입수

<203> 실시예 2

<204> 단백질-형광물질 결합체 제조

<205> 측정하고자 하는 분석물에 대한 마우스 단일클론항체와 표준물질로 사용할 mouse IgG에 대한 anti-mouse IgG에 신호 발생원인 형광물질을 다음과 같은 방법으로 중합하여 실험에 사용하였다. 형광물질 결합에 사용한 단일클론항체와 anti-mouse IgG은 95% 이상의 고순도로 정제

된 것을 사용하며, 농도는 1mg/ml 이상의 농도에서 결합비율이 개선됨을 발견하였다. 형광물질과의 반응을 용이하게 하기 위하여 정제된 단일클론항체와 anti-mouse IgG를 암모니아와 아민이온이 들어 있지 않은 완충용액으로 (0.1M sodium bicarbonate, pH 8.5) 4℃ 냉장실에서 12-24시간 동안 투석하고 완충용액에서 투석된 단백질에 Alexa 647 형광물질을(Molecular Probes, USA) 직접 첨가하여 천천히 섞어 준 후 4℃ 냉장고에서 1-2시간 동안 교반기를 사용하여 반응시켰다.

<206> 실시예 3

<207> 단백질-형광물질 결합체의 정제

<208> Sephadex G-25를 충전한 분배 컬럼을 사용하여 단백질-형광물질 중합체와 반응하지 않고 남아있는 여분의 형광물질을 제거하였다. 정제된 단백질-형광물질 중합체는 사용하기 전까지 -20℃ 이하 냉동고에 보관하였다.

<209> 실시예 4

<210> 니트로셀룰로스 막의 단백질 고정화

<211> 주사기 펌프에 연결된 미세 분주기(Biodot Dispenser)를 이용하여 단백질을 가는 선의 형태로 농도와 분주량을 달리하여 니트로셀룰로스 막위에 분주하였다. 분주한 이후에 온도는 25℃, 습도는 35-50%로 유지되는 제습 장치 안에서 2시간 동안 분주된 단백질을 고정화하였다.

이어 단백질의 안정화와 반응물 사이의 비특이적 반응을 막기 위해 분주된 막을 안정액(1% BSA, 0.05% 트윈 20, 1% 수크로즈, 0.1% PVA의 혼합액)에 처리하여 5분 동안 평형화시켰다. 위의 안정액 성분중에서 BSA는 젤라틴으로 트윈 20은 트리톤 X-100으로 수크로즈는 트레할로즈 (trehalose)로 PVA(폴리비닐알코올)는 PEG 또는 PVP(폴리비닐피롤리돈)로 각각 대체하여 사용할 수도 있다. 처리된 막 표면의 과도한 용액을 제거하고 40℃에서 30분 동안 건조하였다. 건조된 막은 마찬가지로 25℃, RH 35 내지 50%가 유지되는 보관용기 안에서 사용 전까지 보관하였다.

<212> 실시예 5

<213> 샘플패드의 전처리

<214> 니트로셀룰로스 막을 통한 용액 성분들의 이동을 용이하게 하며, 또한 반응의 감도를 유지하고 단백질-형광물질 중합체와 시료 사이의 비특이적 반응에 의한 시험결과의 오류를 막기 위하여 샘플패드를 전처리 하였다.

<215> 샘플패드(2.5 X 30 cm)를 전처리 용액(20mM 트리스-Cl, 0.1% 트리톤 X-100, 0.05% NaN₃, pH 8.5)에 1mL씩 충분히 적셔 10분간 평형화시켰다. 전혈을 시료로 사용할 경우에는 다른 전처리 용액(PBS, 10mM 포스페이트, 150 mM NaCl, 1% BSA, 0.05% 트윈 20, 0.05% NaN₃, pH 7.4)을 사용하여 적혈구 용혈현상을 방지하였다. 이어 샘플패드의 과도한 용액을 제거하고 열에 의한 샘플패드의 변형을 막기 위해 50℃ 내지 60℃의 온도에서 1시간 동안 진공 건조하였다. 단

백질-형광물질 결합체의 변성을 최소화하기 위하여 동결건조방법을 택하였다. 준비된 패드는 위의 막과 동일한 조건의 보관용기에서 사용하기 전까지 보관하였다.

<216> 실시예 6

<217> 결합체 방출 패드 제조

<218> 검출하고자 하는 물질의 탐지자인 단백질-형광물질 결합체를 유리섬유질의 패드에 고정화하여 검출과정을 윈스텝으로 단순화하였다.

<219> 단백질-형광물질 결합체를 희석용 완충용액(PBS, 0.1% 젤라틴, 0.1% 트윈 20, pH 7.4)에 1/1000, 1/500, 1/100의 비율로 각각 희석하였다. 위의 혼합물은 유리섬유에 충분히 적셔 5분 동안 상온에서 평형화시킨 후 건조하는 것이 일반적인 방법이지만, 혼합물이 유리섬유의 표면에서 불균등하게 재분배되는 현상을 막고 소요되는 혼합물의 양을 줄이기 위해, 적시는 방법 대신 미세 분주기를 사용하여 10, 15, 20ul/cm의 양으로 각각 분주하였다. 결합체 방출 패드(단백질-형광물질 결합체 패드)는 세 가지 방법으로 건조하였다. 첫째, 단백질 성분의 안정성을 고려하여 40℃ 이하의 온도로 6시간 동안 진공 건조 시켰고, 둘째, 제습 장치안에서 16시간 동안 실온 건조하였다. 세 번째는 첫번째 방법보다는 다소 시간이 걸리지만, 단백질 성분의 불활성 가능성을 더욱 줄이고자 동결건조방법을 택하였다. 준비된 결합체 패드는 위의 막과 동일한 조건의 보관용기에서 사용하기 전까지 보관하였다.

<220> 실시예 7

221> NC(니트로셀룰로즈) 막 위에 표준 물질과 항체의 분주

222> 고정하고자 하는 각각의 단백질을 PBS 완충액에 1, 2mg/ml로 희석하고 분주기(Bio Dot dispenser)를 사용하여 0.88uL/cm의 양으로 선의 폭을 0.8mm가 되도록 NC 막 위에 분주한 후, RH 35~50%에서 2시간 동안 고정화하였다. 이어 단백질의 안정화와 반응물 사이의 비특이적 반응을 막기 위해 분주된 막을 안정액(1% BSA, 0.05% 트윈 20, 0.1% PVA의 혼합액)에 처리하여 5분 동안 평형화시켰다(위의 안정액 성분 중 BSA는 젤라틴으로, 트윈 20은 트리톤 X-100으로, 수크로즈는 트레할로즈로, PVA는 PEG 나 PVP로 각각 대체하여 사용할 수도 있다). 처리된 막은 표면의 과도한 용액을 제거하고 40℃에서 30분 동안 건조하였다. 시험에 사용할 막은 샘플 패드와 흡수패드 등을 포개어 붙인 후 절단기를 사용하여 4mm 폭으로 잘라 최종 스트립의 크기가 4×60mm이 되도록 하였다. 이 방법을 적용한 예시의 결과는 다음과 같아서, 마우스 IgG를 사용하여 저준위와 고준위의 두개의 표준선을 검사선 전에 분주하고 시료에 들어있는 AFP농도의 회복률을 표준선을 검사선 전과 후에 고정한 것과 비교하여 보았다. 그 결과를 아래 표에 정리하였다.

<223> 실시예 8

<224> 분석물의 정량(단일 시험선)

<225> NC막의 시험선 구역에는 분석하고자 하는 PSA(전립선 특이 항원)에 대한 포획 항체(1 mg/ml)를, 표준선에는 토끼 IgG(1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml)를 각각 0.88

$\mu\text{l}/\text{cm}$ 의 양으로 분주하였다. 분주된 막은 RH 35~50%에서 2시간 동안 고정화하였다. 이어 단백질의 안정화와 반응물 사이의 비특이적 반응을 막기 위해 분주된 막을 안정액(1% BSA, 0.05% 트윈 20, 0.1% PVA의 혼합액)에 처리하여 5분 동안 평형화시켰다. 처리된 막은 표면의 과도한 용액을 제거하고 40℃에서 30분 동안 건조하였다. 분석하고자 하는 단백질과 항원-항체 반응을 통해 반응하는 물질을 Alexa 647로 형광 표시하였다. 또한 표준선에 분주된 단백질과 항원-항체반응을 통해 결합하는 항체를 Alexa 647로 형광표지하였다. 단백질-형광물질 결합체를 희석용 완충용액(PBS, 0.1% 젤라틴, 0.1% 트윈 20, pH 7.4)에 1/100의 비율로 희석하였다. 이 혼합액에 안정화물질인 5% 트레할로스를 첨가하고 분주기를 사용하여 유리질 섬유표면에 20 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 의 양으로 분주한 후, 단백질-형광물질 결합체 패드는 동결 건조하였다. 준비된 NC막과 결합체 방출 패드는 샘플패드 및 흡수패드와 함께 지지대 위에 고정되어 플라스틱 하우징에 조립되었다. PSA 표준용액은 희석 완충액(PBST, 10 mM 포스페이트, 150 mM NaCl, 0.3% 트윈 20, pH 7.4)으로 희석하여 0, 4, 8, 16, 32 ng/ml이 되게 준비하였다. 제조된 표준용액은 PSA ELISA 키트를 사용하여 농도를 재확인하였다. 표준선에 분주된 단백질의 경우, 위에서 준비된 각각의 표준용액을 검정키트의 검체투입구에 적하하고 10분 뒤에 본 발명의 레이저 유발 형광 검출 장치의 투입구에 주입하였다. 이 장치는 주입된 검정키트의 시험선과 표준선 위에 적층된 탐지자-분석물-포획자 결합체의 형광양의 피크로 표시하고 그 양을 모니터 상에 출력하도록 설계되었다. 분석물의 8 ng/ml PSA와 유사한 피크를 갖는 토끼 IgG의 양(0.1 mg/ml)을 표준선에 분주할 양으로 결정하였다. 위의 표준선 농도결정이 끝나면, 동일한 방법으로 각각의 PSA 표준물질을 검정키트에 적하하였다. 10분 후, 시험선과 표준선위에 적층된 형광양의 비율은 다항회귀법을 통하여 유추된 식에 대입되고 결과적으로 분석물의 형광양은 수치값으로 전환되어 검출 장치의 화면상에 출력되었다.

26> 실시예 9

227> 총/유리 PSA의 정량

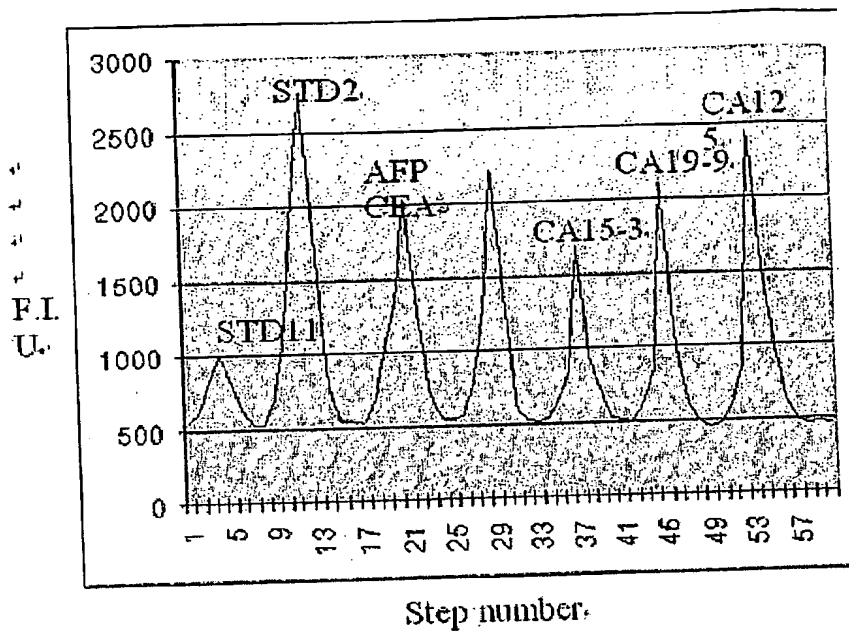
228> 총 PSA와 유리 PSA에 특이적으로 반응하는 모노클로날 항체(1 mg/ml)를 NC 막 위에 0.88 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 의 양이 되도록 분주하여 고정시켰다. 고정화된 포획항체와는 다른 항원결정기를 갖는 모노클로날 항체를 Alexa 647 형광 물질과 결합시켜, 탐지자로 사용될 항체-형광물질 결합체를 준비하였다. 이를 안정화 물질인 트레할로즈 5%, 젤라틴 1%가 포함된 PBS 완충액과 혼합하여 1/100으로 희석시켜, 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 의 양으로 유리질 섬유에 적신 후 동결 건조하여 항체-형광물질 결합체 패드를 제조하였다. PSA 표준용액은 희석 완충액(PBST, 10mM 포스페이트, 150mM NaCl, 0.3% 트윈 20, pH 7.4)으로 희석하여 0, 4, 8, 16, 32 ng/ml이 되게 준비하였다. 제조된 표준용액은 PSA ELISA 키트를 사용하여 농도를 재확인하였다. 각 농도의 표준용액을 검사 스트립의 샘플 투입부에 첨가하고, 15분 후에 본 발명의 레이저 유발 형광 검출 장치를 사용하여 각 시험 구역(test zone; 총 PSA, 유리 PSA의 두 구역)의 형광의 세기를 측정하여 정량 분석하였다. 표준용액이 아닌 실험체인 혈청 혹은 전혈의 경우, 먼저 PSA ELISA 키트로 농도를 확인한 후, 검체를 검사 스트립에 첨가하여 레이저 유발 형광 검출 장치로 총 PSA 및 유리 PSA의 양을 정량 분석하였다. 이의 결과는 각각 도 19 및 도 20에 나타나 있다.

<229> 실시예 10

<230> AFP, CEA, CA15-3, CA19-9, CA125의 특이항원의 정량 (다수 시험선)

231> α -펩토프로테인(Alpha Feto Protein, AFP, 간암의 표지물질), 암태아성 항원 (Carcinoembryonic Antigen, CEA, 많은 종류의 암 표지자이나 주로 대장암에 사용), CA15-3, CA19-9, CA125의 특이항원에 특이적으로 반응하는 단일클론항체(1mg/ml) 중 세 종류 이상을 나이트로셀룰로즈막 위에 가는 선으로 분주하여 고정시킨다. 고정화된 포획항체와는 다른 항원 결합기를 갖는 단일클론 항체를 Alexa 647 형광 물질과 결합시켜, 탐지자인 항체-형광물질 결합체들을 준비한다. 이들을 1/100로 희석해 항체-형광물질 결합체 탐지버프를 제조한다. 표준 용액은 분석하려는 표준물질들을 희석 완충액 (PBST, 10mM phosphate, 150mM NaCl, 0.3% tween20, pH7.4)으로 희석하여 각각의 분석물의 임상적으로 중요한 컷-오프 값을 포함하는 적절한 다른 농도를 준비한다. 제조된 표준용액은 ELISA 키트를 사용하여 농도를 재확인하였다. 각 농도의 표준용액과 탐지버프를 검사 스트립의 샘플 투입부에 첨가하고, 15분 후에 형광분석기에서 스캐닝하여 형광의 세기를 측정하고 표준선과의 비에 의해서 각각의 분석물의 농도를 정량화 하였다. 이 방법의 실시 예로서 형광면역크로마토그래피법에 의한 AFP, CEA, CA15-3, CA19-9, CA125의 분석의 경우를 들어보자. 우선 마우스 IgG로 두개의 표준선을 먼저 전개막위에 고정하고AFP, CEA, CA15-3, CA19-9, CA125에 대한 포획항체를 순서대로 일정한 간격을 두고 표준선 뒤에 분주하여 고정하고 시료에 들어있는 각각의 특이항원을 탐지항체가 들어있는 탐지버프와 형광분석기를 이용하여 측정하였다. 아래의 그림에서 보여주는 바와 같이 포획항체와 탐지항체들은 각각의 항원을 특이적으로 인지하였으며 농도 의존적으로 형광의 강도를 탐지하였다.

>232



- <233> STD:mouse IgG-표준선
- <234> AFP(alpha-fetoprotein):15ng/ml-liver
- <235> CEA(carcinoma embryonic antigen):15ng/ml-colorectal
- <236> CA15-3:30UI/ml-breast
- <237> CA19-9:35UI/ml-ovary
- <238> CA125:40UI/ml-uterus
- <239> 실시예 11
- <240> 형광물질 표지된 항원 또는 항체의 제조

<41> 여러 종류의 형광물질을 항원과 항체에 결합하여 비교 분석하였다.

FITC(fluorescein-isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 그리고 Alexa, Cy3, Cy5 (Molecular Probes, Inc)등을 항원과 항체에 결합시켜 시험을 수행한 결과, Alexa시리즈와 Cy3 & 5 형광 물질이 안정성과 재현성 면에서 좋은 결과를 보였다. 차후의 실험은 Alexa 647을 기본형광물질로 하여 진행되었다. 결합된 형광-항원/항체 결합체는 안정적인 반응성을 보였으며 상당 기간이 지나도 표백효과 없이 사용할 수 있었다.

<242> 실시예 12

<243> 단백질-형광물질 결합체의 농도 및 니트로셀룰로스 막 위의 고정 단백질의 농도 결정

<244> 측정하고자 하는 물질을 검출하는데 필요한 탐지자 및 포획단백질의 적정 농도를 결정하기 위해 연속 희석 실험을 수행하였다. 단백질의 농도를 달리해서 포획단백질을 NC 막 위에 고착한 후, 단백질-형광물질 결합체의 농도를 연속 희석하여 준비하였다. 각 검출물질의 표준 용액을 단백질-형광물질 결합체와 혼합하여 섞은 후 검사 스트립에 적용하여 본 발명의 레이저 유발 형광 검출 장치로 분석하였다. 고정된 단백질의 농도는 각각의 측정항목에 따라서 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 mg/ml로 하였으며, 분주량은 0.88 ul/cm로 하였다. 포획단백질의 농도가 일정한 상태에서 단백질-형광물질 결합체의 농도를 감소 또는 증가시켰을 경우에는 동일 농도의 측정물질에 대한 형광 신호의 세기가 감소 또는 증가하였다. 반대로, 단백질 형광물질 결합체의 농도를 일정하게 하고 포획단백질의 농도를 변화시켰을 때에도 동일한 결과를 보였다. 두 실험 모두에서 농도가 어느 한계를 넘어 증가될 경우에는 비특이적 반응이 증가하였다.

위의 결과를 종합하여 측정하고자 하는 물질의 검출한계를 최저로 낮추면서도 시료물질과 포획 및 탐지자 사이의 비특이적 반응을 최소화시키는 조건의 농도를 결정하였다.

<245> 실시예 13

<246> 분석물의 최저 검출 한계 및 직선성

<247> 실시예 12에서 결정된 적정농도의 PSA 단일클론 항체를 $0.88 \mu\text{l}/\text{cm}$ 의 양으로 NC 막에 분주하고 위의 방법에 따라 제조된 스트립에 실시예 12에서 결정된 값으로 희석된 항체-형광물질 결합체를 완충액(트레할로즈 5%, 젤라틴 1%가 포함된 PBS, pH 7.4)에 혼합한 후 $20 \mu\text{l}/\text{cm}$ 의 양으로 유리질 섬유에 분주한 후 동결 건조하여 항체-형광물질 결합체 패드를 제조하였다. 이어 1 mg/ml 내지 1 pg/ml까지 농도를 달리한 PSA 표준물질을 첨가하여 분석물의 최저검출한계 및 검정키트의 직선성 범위를 형광분석기를 사용하여 결정하였다. 도 14에서 보는 바와 같이 PSA의 경우 최저검출한계는 10 pg/ml이었고 PSA 검정키트의 직선성은 10 pg/ml 내지 1 ug/ml까지의 상당히 넓은 범위를 보였다. 실시예 10의 AFP, CEA, CRP의 최저 검출한계 역시 진단에서 필요로 하는 컷오프 값보다 훨씬 낮은 값을 측정할 수 있었다.

<248> 실시예 14

<249> 본 발명의 레이저 유발 형광 검출 장치와 대조를 위해 종래의 레이저 유발 형광 검출 스캐너 Scan Life(GSI 제품)를 사용하여 형광을 측정하고 형광 세기를 서로 비교하였다.

250> 분석물 PSA를 각각의 농도 별로 준비하여 단백질 형광물질과 혼합하여 섞은 후 실시예 7
 에서와 같이 스트립에 적용하여 상기 종래의 스캐너로 이미지화하였다. 동일한 방법 및 조건으
 로 제조된 측방 유동 점정 스트립을 본 발명의 레이저 유발 형광 검출 장치로 이미지화하였다.
 이미지화된 데이터는 관련된 프로그램을 사용하여 수치화 하였다. 이의 결과는 도 15에 기록
 되어 있다. 도 15의 기록으로부터, 본 발명에 따른 레이저 유발 형광 검출 장치와 종래의 형
 광 검출 스캐너 모두 분석물의 농도에 따라서 증가된 형광 세기를 보였으나, 같은 분석물에 대
 해 본 발명에 따른 레이저 유발 형광 검출 장치를 이용하여 측정된 형광 세기는 종래의 형광
 검출 스캐너를 이용하여 측정된 형광 세기에 비하여 현저히 높음을 알 수 있다.

<251> 실시예 15

<252> 표준선(internal standard)의 위치에 따른 시험

<253> 스트립상에서 표준선의 위치를 결정하기 위하여 시험선의 전방에 위치하도록 스트립을
 제조하였다. 마우스 IgG를 AFP에 대한 항체를 고정한 검사선 전에 고정하여 분석시료 중에 들
 어 있는 AFP의 농도를 형광으로 표지된 anti-mouse IgG와 anti-AFP antibody가 들어 있는 탐지
 버프를 사용하여 여러 번 측정하고 그 CV값을 마우스 IgG를 검사선 후방에 고정하였을 때와
 비교하였다. 또한 토끼 IgG와 avidin도 표준선 위에 고정하여 같은 조건하에서 비교 하였으며,
 그 비교 결과는 아래 표와 같았다.

54>

표준물질의 고정 위치에 따른 CRP 농도의 CV 값의 비교						
표준물질	mouse IgG		Rabbit IgG		Avidin	
표준선의 위치	전방	후방	전방	후방	전방	후방
CV value (%)	5	8.5	9.2	10	10	13.7

255> 위의 표에서 보는 바와 같이 표준물질을 mouse IgG를 사용하여 검사선 전에 고정하였을 때가 분석물인 AFP 농도의 CV값을 가장 낮게 나타내어 가장 좋은 AFP 농도의 재현성을 보여 줌을 알 수 있었다.

256> 실시예 16

257> 은(Ag) 또는 탐지자가 반응할 수 있는 은선(Ag line)을 상기 검사창의 후방에 분주

258> 후크 이펙트(Hook effect)는 은(Ag)이 과도하게 존재할 때 일어나는 현상으로 후크 이펙트에 의한 폴스 네가티브(false negative)는 진단에 있어서 치명적인 오류를 야기시킨다. 본 시스템과 같이 탐지자(detector)와 은을 혼합하여 포획자(capture Ab)에 결합시켜 은의 농도를 정량화하는 방법은 후크 이펙트가 발생하여 판독에 오류를 가져올 확률을 내포하고 있다. 정상인 경우 과도하게 들어간 탐지자가 은을 잡고 여분의 탐지자가 은을 고정시킨 선에 결합함으로써 신호가 발생한다. 도 18 및 도 20에서와 같이, 시험선(30)에서는 은의 농도에 따라 신호가 증가하나 은선(Ag line)(61)에서는 은의 농도가 높을수록 자유로운 탐지자(free detector)가 소진되어 일정 농도가 지나면 신호가 작아지게 된다.

259> 탐지자와 혼합된 은이 과도하게 많을 경우 자유로운 탐지자가 없기 때문에 은선이나 포획선(capture line)에서의 신호가 발생하지 않는다. 따라서 탐지자에 은이 혼합되지 않은 상

황과 구별이 되고 자유로운 탐지자의 조진량에 따라 은선의 신호 변화를 환산할 수 있게 되어 시스템의 검출 범위를 넓힐 수 있게 된다.

260> 대사 물질 조절 단백질(Catabolite Regulatory Protein, CRP)을 분석물로 하여 측정한

결과는 도 21 내지 도 23에 나타난 바와 같았다.

261> 따라서, 시험선(30) 다음에 은선(61)을 덤으로써 시스템의 검출 범위를 1-100 μ g/ml로 넓힐 수 있다.

<262> 실시예 17

<263> NC(니트로셀룰로즈) 막 위에 아비딘 분주

<264> 고정하고자 하는 아비딘을 PBS 완충액에 1 또는 2 mg/ml로 희석하고 분주기(Bio Dot Dispenser)를 사용하여 0.88 μ L/cm의 양으로 선의 폭을 0.8mm가 되도록 NC 막 위에 분주한 후, RH 35~50%에서 2시간 동안 고정화하였다. 이어서, 단백질의 안정화와 반응물 사이의 비특이적 반응을 막기 위해 분주된 막을 안정액(1% BSA, 0.05% 트윈 20, 0.1% PVA의 혼합액)에 처리하여 5분 동안 평형화시켰다(위의 안정액 성분 중 BSA는 젤라틴으로, 트윈 20은 트리톤 X-100으로, 수크로즈는 트레할로즈로, PVA는 PEG 나 PVP로 각각 대체하여 사용할 수도 있다). 처리된 막은 표면의 과도한 용액을 제거하고 40 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 건조하였다. 시험에 사용할 막은 샘플패드와 흡수패드 등을 포개어 붙인 후 절단기를 사용하여 4mm 폭으로 잘라 최종 스트립의 크기가 4 \times 60mm이 되도록 하였다.

265> 실시예 18

266> 아비딘-바이오틴을 이용한 분석물의 정량(단일 시험선)

267> NC막의 시험선 구역에는 아비딘(1 mg/ml)을, 표준선에는 토끼 IgG(0.1 mg/ml)를 각각 0.88 μ l/cm의 양으로 분주하였다. 분주된 막은 RH 35~50%에서 2시간 동안 고정화하였다. 이어서, 단백질의 안정화와 반응물사이의 비특이적 반응을 막기 위해 분주된 막을 안정액(1% BSA, 0.05% 트윈 20, 0.1% PVA의 혼합액)에 처리하여 5분 동안 평형화시켰다. 처리된 막은 표면의 과도한 용액을 제거하고 40℃에서 30분 동안 건조하였다. 분석하고자 하는 단백질과 항원-항체 반응을 통해 반응하는 물질을 Alexa 647로 형광 표시하였고, 기존에 분석하고자 하는 물질을 포획하던 단백질에는 바이오틴을 결합시켰다. 또한, 표준선에 분주된 단백질과 항원-항체 반응을 통해 결합하는 항체를 Alexa 647로 형광표지하였다. 단백질-형광물질 결합체와 단백질-바이오틴 결합체를 희석용 완충용액(PBS, 0.1% 젤라틴, 0.1% 트윈 20, pH 7.4)에 1/100의 비율로 희석하였다. 준비된 NC막과 샘플페드는 흡수패드와 함께 지지대 위에 고정되어 최종 스트립의 크기가 4×60mm가 되도록 잘라서 플라스틱 하우징에 조립하였다. PSA 표준용액은 희석 완충액(PBST, 10 mM 포스페이트, 150 mM NaCl, 0.3% 트윈 20, pH 7.4)으로 희석하여 0, 4, 8, 20, 40 ng/ml이 되게 준비하였다. 제조된 표준용액은 PSA ELISA 키트를 사용하여 농도를 재확인하였다. 위에서 준비된 각각의 표준용액과 단백질-형광 결합체 및 단백질-바이오틴 결합체, 표준선의 물질을 인식하는 단백질-형광 결합체를 본 발명의 소형 스캐너에 포함된 스트립에 적하하고 10분 뒤에 레이저 유발 형광 검출 장치의 투입구로 스트립이 전달되도록 하였다. 이 장치는 스트립의 시험선위에 적층된 탐지자-분석물-포획자 결합체의 형광양과 표준선 위에 적층된 단백질-형광 결합체의 형광양의 피크로 표시하고, 시험선과 표준선에 적층된 형광양의 비

울은 다항회귀법을 통하여 유추된 식에 대입되고 결과적으로 분석물의 형광량은 수치값으로 전환되어 검출 장치의 화면상에 출력되었다. 이의 결과는 아비딘-바이오틴을 이용하는 경우 보다 더 높은 감도를 얻을 수 있고 또한 재현성도 우수하다는 것을 알 수 있다.

【발명의 효과】

:268> 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 일선 병의원에서 진단시점에서 바로 진단결과를 정량적으로 확인할 수 있고 특정 질환과 관련된 측방유동 검출식 바이오칩을 최적화함으로써 목표로 하는 표지인자의 검출에 특화된 성능을 발휘하며, 더욱 정확한 분석물의 정량화를 가능하게 하고, 한번의 시료 분석을 통하여 여러 암표지 인자들을 동시에 분석할 수 있도록 하며, 후크이펙트(Hook effect)를 줄이고 검출 범위를 넓히고, 분석물의 농도를 정확하게 측정할 수 있는 측방 유동 정량 검정 방법 및 이를 위한 스트립과 레이저 유발 표면형광 검출 장치 및 소형 스캐너를 제공하는 효과가 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

크로마토그래피 매질상의 한쪽 말단에 분석물이 함유된 것으로 예상되는 액체 시료를 적하하여 액체 시료가 크로마토그래피 매질을 통해 이동되도록 하고, 액체 시료 중의 분석물은 액체 시료가 적하된 구획으로부터 크로마토그래피 매질을 따라 전개하는 방향으로 일정한 간격을 두고 위치한 구획에 흡착되어 있는 표지된 탐지자와 반응하여 분석물-표지된 탐지자의 결합체를 형성하며, 분석물-표지된 탐지자의 결합체는 크로마토그래피 매질을 통해 이동하면서 상기 탐지자와 동일하거나 상이하며 비표지되어 상기 크로마토그래피 매질상의 중간 정도 위치에 설정된 검사창에 고정된 포획자와 반응함으로써 표지된 탐지자와 비표지된 포획자 사이에 분석물이 샌드위치로 포획되어 형성된 표지된 탐지자-분석물-비표지된 포획자의 복합체를 형성하고, 이에 따라 형성된 복합체의 양을 측정하여 시료 중의 분석물을 결정하는 측방유동 정량 측정 방법에 있어서,

상기 표지된 탐지자는 형광물질로 표지되어 액체 시료중의 분석물과 반응하여 형광물질 표지된 탐지자-분석물의 결합체를 형성하고; 비표지된 포획자는 크로마토그래피 매질상의 검사창에 선으로 분주되어 크로마토그래피 매질을 따라 이동해 온 상기 결합체와 반응하여 형광물질 표지된 탐지자-분석물-비표지된 포획자의 복합체를 형성하고; 상기 형광물질 표지된 탐지자가 흡착되어 있는 크로마토그래피 매질상에, 상기 탐지자와 동일한 형광물질로 표지되고 상기 탐지자 및 포획자와 상이하며 액체 시료중의 표준물과 반응하는 표준 탐지자가 함께 흡착되어 있으며, 크로마토그래피 매질상의 검사창을 기준으로 전방에, 상기 형광물질 표지된 표준 탐지자와 반응하는 비표지된 표준 포획자가 표준선으로서 두개의 선으로 분주 고정되어 있어 액체

시료가 크로마토그래피 매질을 따라 이동하면서 형광물질 표지된 표준 탐지자-표준물-비표지된 표준 포획자의 표준 복합체를 형성하며; 상기 복합체 및 표준 복합체의 표면형광 매질에 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈로부터 입사하고 여기필터에 통과한 빛을 조사하여 이로부터 반사된 빛을 포집렌즈에 통과시켜 평행광을 형성하고, 이 평행광을 형광필터에 통과시켜 산란광을 걸러내고 순수한 형광성분만 집광렌즈로 입사시키고, 이 집광렌즈에 의해 순수한 형광 성분이 공간필터의 중심으로 집속되며, 상기 공간필터에서 평행광선 이외의 빛을 제거하고, 이 평행광선이 광검출기로 입사되며, 광검출기로 입사된 평행광선이 아날로그 디지털 컨버터(ADC)를 통해 CPU로 전달되어 상기 복합체의 형광 양을 상기 표준 복합체가 나타내는 표준 형광 양에 대하여 상대적으로 비교하여 분석물의 양을 결정하는 측방 유동 정량 검정 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 은(Ag) 또는 탐지자가 반응할 수 있는 은선(Ag line)을 상기 검사창의 후방에 추가로 분주 고정하여 상기 은선의 신호 변화를 환산하여 신호 검출 범위를 넓힐 수 있는 것을 특징으로 하는 측방 유동 정량 검정 방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 분주 고정되는 비표지된 표준 포획자는 마우스(mouse) IgG인 것을 특징으로 하는 측방 유동 정량 검정 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 탐지자가 3 내지 5 종류이고 이에 따라 AFP, CEA, CA15-3, CA19-9, CA125 중에서 탐지자의 종류와 동일한 수의 포획자가 선택되어 동일한 수의 선으로 검

사창에 분주 고정되어 3 내지 5 종류의 분석물을 동시에 정량할 수 있음을 특징으로 하는 측방 유동 정량 검정 방법.

【청구항 5】

지지대(backing), 지지대의 한쪽 말단 상에 접착되어 있고 액체 시료가 투입되는 시료 패드(sample pad), 지지대의 다른 쪽 말단 방향으로 시료 패드의 말단에 한쪽 말단이 겹쳐서 지지대에 접착되어 있고 시료중의 분석물과 반응하여 복합체를 형성하는 표지된 탐지자가 비교 정 흡착되어 있는 결합체 방출 패드(conjugate releasing pad), 지지대의 다른 쪽 말단 방향으로 표지된 결합체 방출 패드의 말단에 한쪽 말단이 겹쳐서 지지대에 접착되어 있고 시료가 전개되며 방출 패드로부터 분리 이동하는 결합체와 샌드위치로 반응 포획하여 복합체를 형성하는 상기 탐지자와 동일하거나 상이한 포획자가 고정되어 있는 크로마토그래피 매질(chromatography medium) 및 크로마토그래피에 의해 이동하는 시료를 흡수하고 또한 표지된 미 반응 물질을 흡수 및 제거하는 흡수패드(absorption pad)를 포함하는 측방 유동 정량 검정 스트립에 있어서,

상기 결합체 방출 패드상에 비고정적으로 흡착되어 있는 탐지자는 형광물질로 표지되어 있고, 추가로 상기 결합체 방출 패드상에는 상기 탐지자의 표지 형광물질과 동일한 형광물질로 표지되어 있고 액체시료중의 표준물과 반응하는 표준 탐지자가 비고정적으로 흡착되어 있으며; 상기 포획자는 크로마토그래피 매질상의 검사창에 선으로 분주 고정되어 있으며; 상기 탐지자 및 포획자와 상이하고 비표지된 표준 포획자가 상기 검사창의 전방에 표준선으로서 두개의 선으로 분주 고정되어 있고; 액체 시료가 크로마토그래피 매질을 따라 이동하면서 상기 검사창에서 형성된 형광물질 표지된 탐지자-분석물-포획자의 복합체 및 상기 표준선에서 형성된 형광물질 표지된 표준 탐지자-표준물-표준 포획자의 표준 복합체의 표면형광 매질은 레이저의 레이저

빔 형상제어용 렌즈로부터 입사하고 여기필터에 통과한 빛을 조사하여 이로부터 반사된 빛을 포집렌즈에 통과시켜 평행광을 형성하고, 이 평행광을 형광필터에 통과시켜 산란광을 걸러내고 순수한 형광성분만 집광렌즈로 입사시키고, 이 집광렌즈에 의해 순수한 형광 성분이 공간필터의 중심으로 집속되며, 상기 공간필터에서 평행광선 이외의 빛을 제거하고, 이 평행광선이 광검출기로 입사되며, 광검출기로 입사된 평행광선이 아날로그 디지털 컨버터(ADC)를 통해 CPU로 전달되어 상기 복합체의 형광 양을 상기 표준 복합체가 나타내는 표준 형광 양에 대하여 상대적으로 비교하여 분석물의 양을 결정하기 위한 스트립.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 은(Ag) 또는 탐지자가 반응할 수 있는 은선(Ag line)을 상기 검사창의 후방에 분주 고정하여 상기 은선의 신호 변화를 환산하여 신호 검출 범위를 넓힐 수 있는 것을 특징으로 하는 스트립.

【청구항 7】

제5항에 있어서, 상기 분주 고정되는 비표지된 표준 포획자는 마우스(mouse) IgG인 것을 특징으로 하는 스트립.

【청구항 8】

제5항에 있어서, 상기 탐지자가 3 내지 5 종류이고 이에 따라 AFP, CEA, CA15-3, CA19-9, CA125 중에서 탐지자의 종류와 동일한 수의 포획자가 선택되어 동일한 수의 선으로 검사창에 분주 고정되어 3 내지 5 종류의 분석물을 동시에 정량할 수 있음을 특징으로 하는 스트립.

【청구항 9】

(i) 지지대(backing), 지지대의 한쪽 말단 상에 접촉되어 있고 액체 시료가 투입되는 시료 패드(sample pad), 지지대의 다른 쪽 말단 방향으로 시료 패드의 말단에 한쪽 말단이 겹쳐서 지지대에 접촉되어 있고 시료중의 분석물과 반응하여 복합체를 형성하는 표지된 탐지자가 비고정 흡착되어 있는 결합체 방출 패드(conjugate releasing pad), 지지대의 다른 쪽 말단 방향으로 표지된 결합체 방출 패드의 말단에 한쪽 말단이 겹쳐서 지지대에 접촉되어 있고 시료가 전개되며 방출 패드로부터 분리 이동하는 결합체와 샌드위치로 반응 포획하여 복합체를 형성하는 상기 탐지자와 동일하거나 상이한 포획자가 고정되어 있는 크로마토그래피 매질(chromatography medium) 및 크로마토그래피에 의해 이동하는 시료를 흡수하고 또한 표지된 미 반응 물질을 흡수 및 제거하는 흡수패드(absorption pad)를 포함하고; 상기 결합체 방출 패드에 비고정적으로 흡착되어 있는 탐지자는 형광물질로 표지되어 있고, 추가로 상기 결합체 방출 패드상에는 상기 탐지자의 표지 형광물질과 동일한 형광물질로 표지되어 있고 액체시료중의 표준물과 반응하는 표준 탐지자가 비고정적으로 흡착되어 있으며; 상기 포획자는 크로마토그래피 매질상의 검사창에 선으로 분주 고정되어 있으며; 상기 탐지자 및 포획자와 상이하고 비표지된 표준 포획자가 상기 검사창의 전방에 표준선으로서 두개의 선으로 분주 고정되어 있는 스트립과; (ii)상기 스트립이 장착되고 하우징의 상판에 샘플 투입구와 경사진 벽면을 형성하고 있는 윈도우를 가지는 카트리지와; (iii)레이저, 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈, 여기 필터, 포집렌즈, 형광필터, 집광렌즈, 공간필터, 광검출기, 아날로그 디지털 컨버터(ADC) 및 CPU로 구성되고, 이들 구성 요소들은 액체 시료가 상기 스트립의 크로마토그래피 매질을 따라 이동하면서 상기 검사창에서 형성된 형광물질 표지된 탐지자-분석물-포획자의 복합체 및 상기 표준선에서 형성된 형광물질 표지된 표준 탐지자-표준물-표준 포획자의 표준 복합체의 표면형

광 매질이 레이저의 레이저빔 형상제어용 렌즈로부터 입사하고 여기필터에 통과한 빛을 조사하여 이로부터 반사된 빛을 포집렌즈에 통과시켜 평행광을 형성하고, 이 평행광을 형광필터에 통과시켜 산란광을 걸러내고 순수한 형광성분만 집광렌즈로 입사시키고, 이 집광렌즈에 의해 순수한 형광 성분이 공간필터의 중심으로 집속되며, 상기 공간필터에서 평행광선 이외의 빛을 제거하고, 이 평행광선이 광검출기로 입사되며, 광검출기로 입사된 평행광선이 아날로그 디지털 컨버터(ADC)를 통해 CPU로 전달되도록 배치되어 있는 레이저 유발 표면형광 검출 장치가, 상기 스트립상에 형성된 상기 복합체의 형광 양 및 상기 표준 복합체의 표준 형광 양이 상기 레이저-유발 표면형광 검출 장치에 의해 측정되고 상대적으로 비교되어 액체 시료중의 분석물 양을 결정할 수 있도록, 일체로 구성된 분석물 정량 소형 스캐너.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 분주 고정되는 비표지된 표준 포획자는 마우스(mouse) IgG인 것을 특징으로 하는 분석물 정량 소형 스캐너.

【청구항 11】

제9항에 있어서, 상기 탐지자가 3 내지 5 종류이고 이에 따라 AFP, CEA, CA15-3, CA19-9, CA125 중에서 탐지자의 종류와 동일한 수의 포획자가 선택되어 동일한 수의 선으로 검사창에 분주 고정되어 3 내지 5 종류의 분석물을 동시에 정량할 수 있음을 특징으로 하는 분석물 정량 소형 스캐너.

【청구항 12】

제9항에 있어서, 상기 스트립에 대한 카트리지의 하우징 벽면의 경사각(α)은 20° 이하인 것을 특징으로 하는 분석물 정량 소형 스캐너.

【청구항 13】

제9항에 있어서, 은(Ag) 또는 탐지자가 반응할 수 있는 은선(Ag line)을 상기 검사창의 후방에 분주 고정하여 상기 은선의 신호 변화를 환산하여 신호 검출 범위를 넓힐 수 있는 것을 특징으로 하는 분석물 정량 소형 스캐너.

【청구항 14】

제9항에 있어서, 상기 카트리지는 하우징 상판에 시간판독 윈도우를 더 포함하고, 스트립상에 pH 페이퍼나 단백질에 부착된 지시자를 부착하여 샘플 투입구를 통해 투입된 샘플이 흡수패드에 도달하고 나서 나타나는 상기 pH 페이퍼나 지시자의 색깔 변화를 시간 판독 윈도우를 통해 확인하여 판독 시작 여부를 확인할 수 있는 것을 특징으로 하는 분석물 정량 소형 스캐너.

【청구항 15】

제9항에 있어서, 상기 카트리지는 하우징 상판에 시간판독 윈도우를 더 포함하고, 스트립 상에 시간관리선으로서 항탐지자 리간드(anti-detector ligand)를 더 분주하며, 상기 시간판독 윈도우를 통해 레이저 유발 표면형광 검출장치로 시간관리선에 쌓인 탐지자에서 발광되는 형광의 세기를 측정하여 판독 시작 여부를 확인할 수 있는 것을 특징으로 하는 분석물 정량 소형 스캐너.

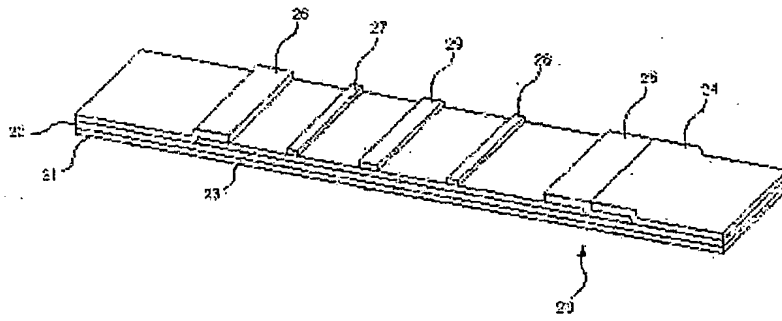


1020040000440

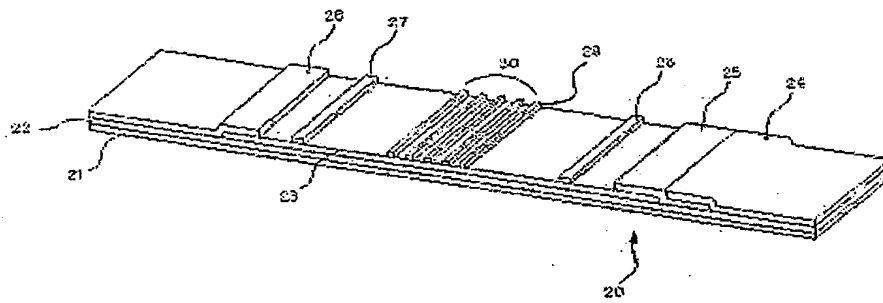
출력 일자: 2005/1/7

【도면】

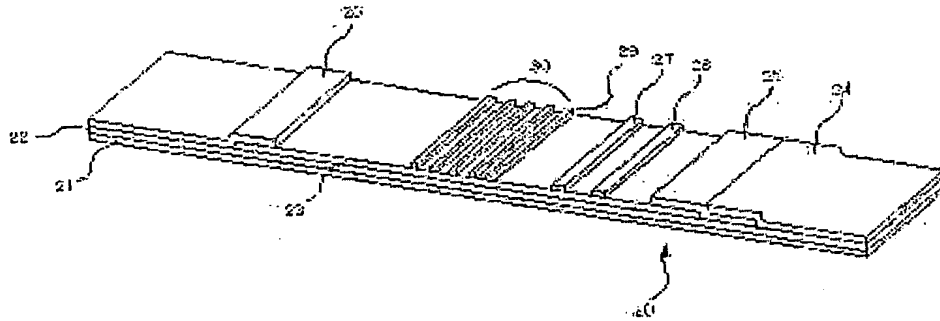
【도 1】



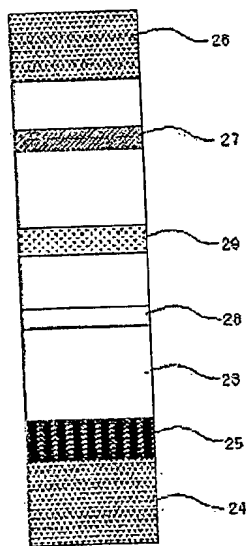
【도 2】



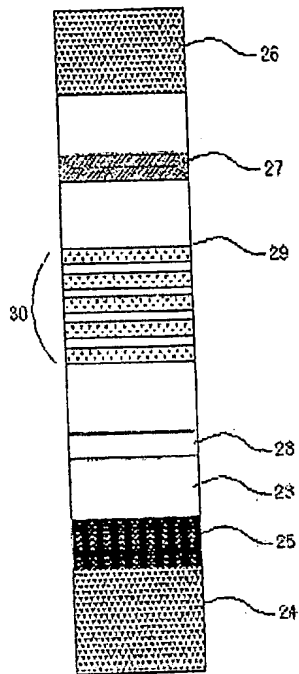
【도 3】



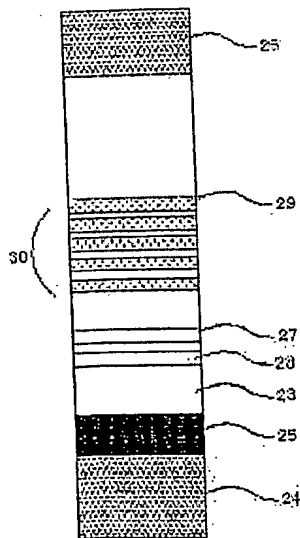
【도 4】



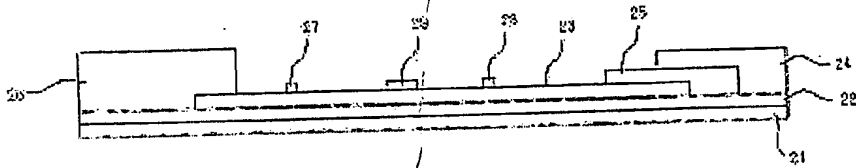
【도 5】



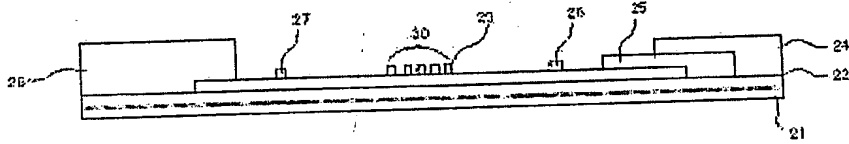
【도 6】



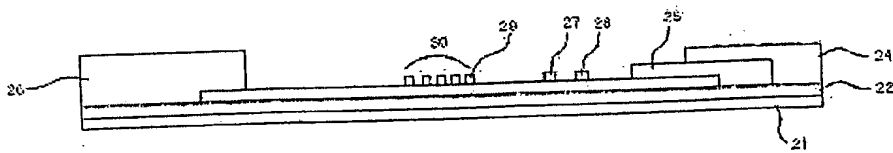
【도 7】



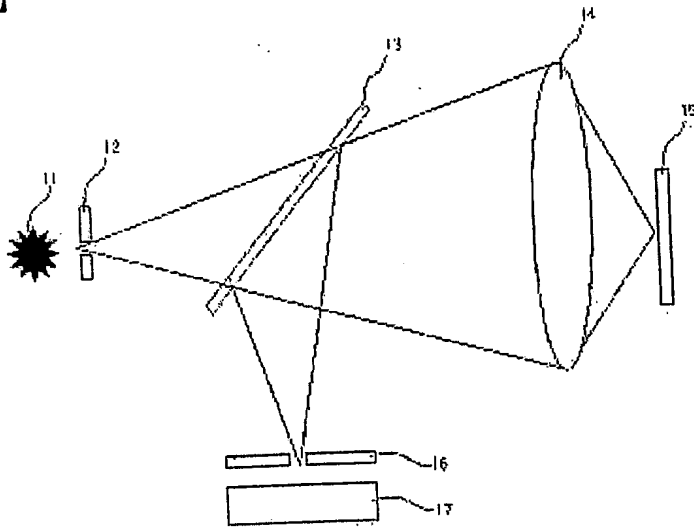
【도 8】



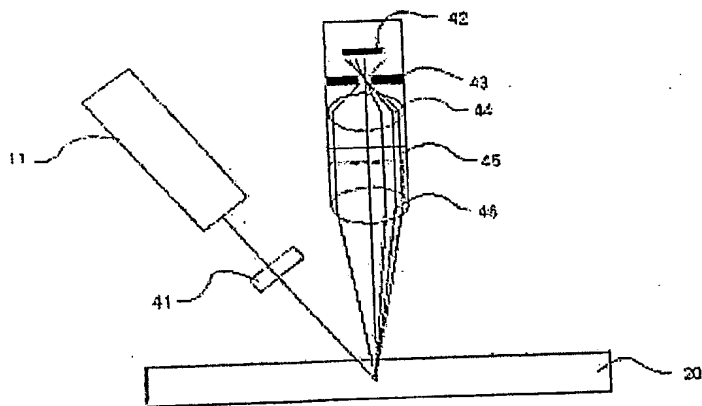
【도 9】



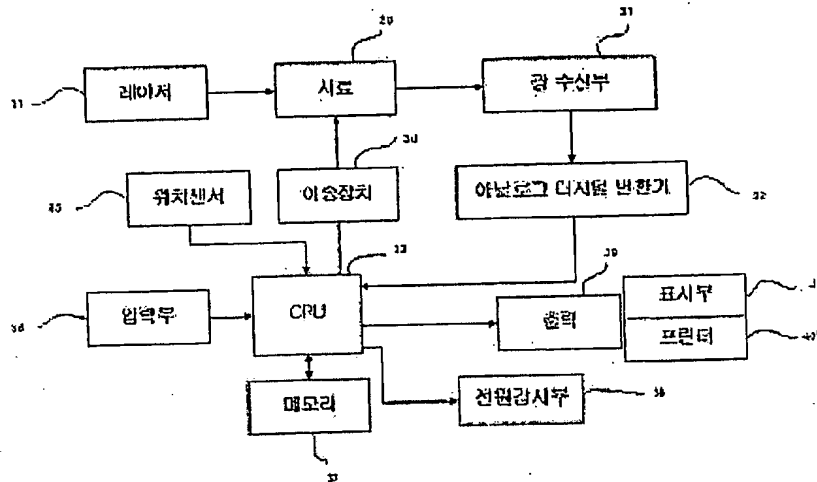
【도 10】



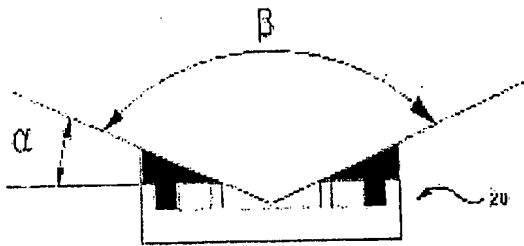
【도 11】



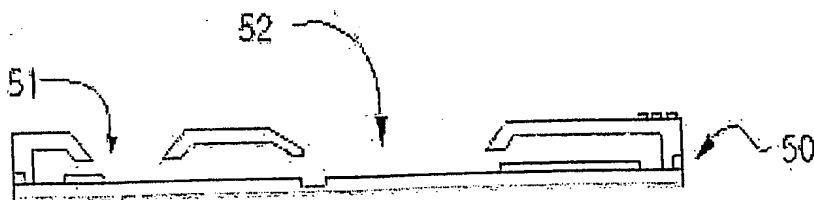
【도 12】



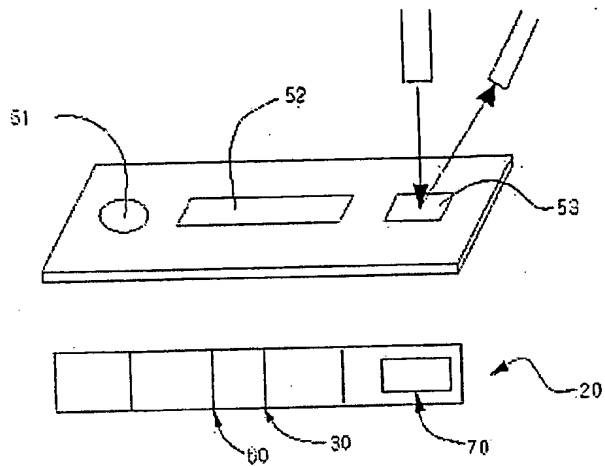
【도 13】



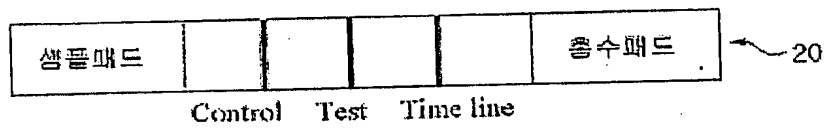
【도 14】



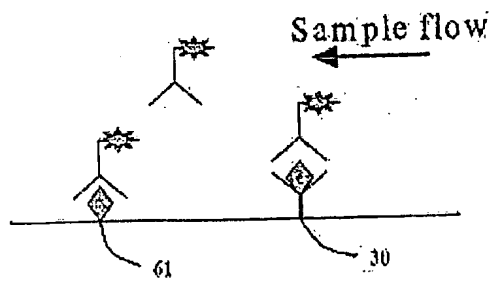
【도 15】



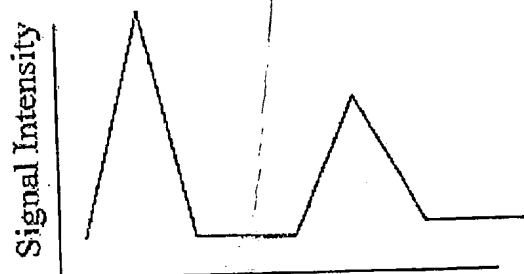
【도 16】



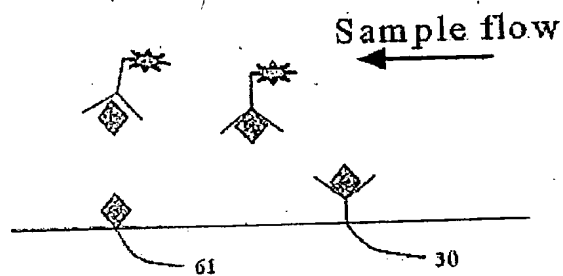
【도 17】



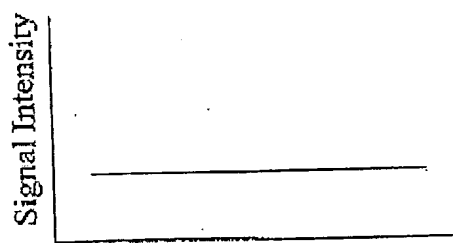
【도 18】



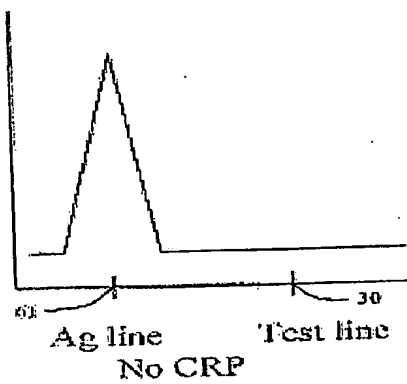
【도 19】



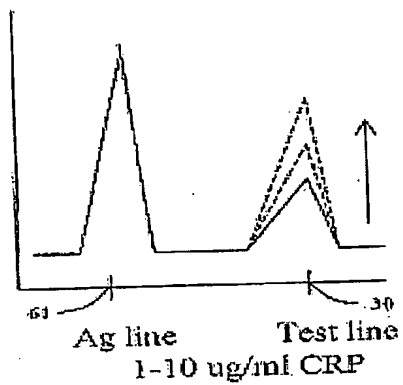
【도 20】



【도 21】



【도 22】



【도 23】

